



VĚDECKÝ VÝBOR FYTOSANITÁRNÍ A ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Klasifikace: Draft	<input type="checkbox"/> Pro vnitřní potřebu VVF
Oponovaný draft	<input type="checkbox"/> Pro vnitřní potřebu VVF
Finální dokument	<input type="checkbox"/> Pro oficiální použití
Deklasifikovaný dokument	<input checked="" type="checkbox"/> Pro veřejné použití

Název dokumentu:

TOXICKÉ ALKALOIDY V POTRAVNÍM ŘETĚZCI ČLOVĚKA

Poznámka:

Zpracovali:

Dr. Ing. Věra Schulzová, VŠCHT Praha.
Prof. Ing. Jana Hajšlová, CSc., VŠCHT Praha.

OBSAH

1 ÚVOD	2
2 ALKALOIDY	4
2.1 Vlastnosti alkaloidů	5
2.2 Výskyt alkaloidů.....	5
2.3 Účinky alkaloidů	7
2.4 Toxikologicky nejvýznamnější skupiny alkaloidů	8
2.5 Steroidní glykoalkaloidy.....	11
2.5.1 Glykoalkaloidy brambor	13
2.5.1.1 Toxicita glykoalkaloidů brambor.....	20
2.5.2 Glykoalkaloidy rajčat.....	21
2.5.2.1 Toxicita glykoalkaloidů rajčat	24
2.5.3 Glykoalkaloidy lilku	25
2.6 Nortropanové alkaloidy kalysteginy	25
2.6.1 Struktura kalysteginů	26
2.6.2 Biosyntéza kalysteginů	27
2.6.3 Obsah kalysteginů v rostlinách čeledi lilkovitých.....	31
2.6.3.1 Obsah kalysteginů v čerstvých a skladovaných rostlinách	31
2.6.3.2 Obsah kalysteginů ve zpracovaných rostlinách	32
2.6.3.3 Obsah kalysteginů v rostlinách určených pro lidskou výživu	32
2.6.4 Hypotéza, proč rostliny syntetizují kalysteginy	33
2.6.5 Toxikokinetika a toxicita kalysteginů.....	34
2.6.6 Kalysteginy jako glykosidázové inhibitory.....	35
2.6.7 Využití kalysteginů v lékařství	35
2.6.8 Zhodnocení poznatků o kalysteginech.....	36
3 STANOVENÍ OBSAHU ALKALOIDŮ.....	37
3.1 Metody stanovení glykoalkaloidů.....	37
3.1.1 Chromatografické metody	37
3.1.1.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	37
3.1.1.2 Plynová chromatografie (GC).....	38
3.1.1.3 Kapalinová chromatografie (HPLC).....	38
3.1.2 Kapilární isotachoforéza	40
3.1.3 Biochemické metody	40
3.1.4 MALDI-TOF MS.....	40
3.2 Metody stanovení kalysteginů	41
3.2.1 Extrakce a přečištění.....	41
3.2.2 Metody stanovení.....	41
3.2.2.1 Plynová chromatografie (GC).....	41
3.2.2.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	42
3.2.2.3 Kapalinová chromatografie (HPLC).....	42
3.2.2.4 Kapilární elektroforéza	43
3.2.3 Syntéza kalysteginu B2.....	44

4 ZÁVĚR	45
5 LITERATURA	47
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	51

1 ÚVOD

Alkaloidy jsou přírodní dusíkaté látky velmi rozdílných struktur a vlastností. Obsahují jeden nebo dva atomy dusíku, který může být buď zabudovaný v kruhu (heterocyklické alkaloidy), nebo v alifatickém řetězci. V rostlinné říši jsou alkaloidy značně rozšířeny a často mají velice silné fyziologické účinky. Patří mezi ně vůbec nejsilnější rostlinné jedy a mnohé z nich jsou v dnešním lékařství nepostradatelné. Jedná se o přirozeně toxické látky, které jsou přirozenou součástí ochranných systémů rostlin. K jejich zvýšené produkci dochází zejména ve stresových situacích, jako jsou nepříznivé klimatické podmínky nebo napadení škůdci. Z hlediska potravního řetězce člověka hrají významnou roli pouze alkaloidy, vyskytující se některých v rostlinách čeledi lilkovitých. Potravinářský význam mají rody lilek (*Solanum*) a rajče (*Lycopersicon*), k nimž se řadí brambory (*S. tuberosum*), lilek vejcoplodý čili baklažán (*S. melongena*) rajčata (*L. esculentum*).¹ Kromě základních potravinářských plodin mohou do potravního řetězce pronikat některé toxické pyrrolizidinové alkaloidy z plevelných rostlin, problém může představovat také izochinolinový alkaloid nezralých makovic – morfin.

Nejdůležitějším zástupcem lilkovitých rostlin jsou brambory, které jsou ve světovém měřítku čtvrtou nejvýznamnější plodinou s produkcí kolem 300 miliónů tun ročně. Roční spotřeba brambor na jednu osobu v ČR činí 80-85 kg. Brambory jsou jednou ze základních složek lidské výživy. Jsou cenným zdrojem nutričně významných látek jako jsou vitaminy (zejména vitamin C), plnohodnotné proteiny, antioxidanty, vláknina a minerální látky. Díky vysokému obsahu škrobu jsou brambory důležitým zdrojem energie. Na druhé straně jsou brambory zdrojem toxických látek, které pochází buď z chemizace zemědělství (dusičnany, těžké kovy a pesticidy) nebo jsou rostlinou syntetizovány (glykoalkaloidy a v poslední době objevená skupina nortropanových alkaloidů – kalysteginy).

Mezi glykoalkaloidy se řadí pestrá skupina biologicky aktivních látek, které se někdy souhrnně označují jako solanin. 95 % glykoalkaloidů konzumních brambor tvoří α -solanin a α -chaconin. Toxický účinek glykoalkaloidů spočívá v inhibici acetylcholinesterázy a porušování buněčných membrán. V České republice je maximální přípustné množství sumy α -solaninu a α -chaconinu v celých neloupaných hlízách 200 mg/kg. Hladiny glykoalkaloidů

v konzumních odrůdách brambor jsou nižší než tento limit a při dodržení vhodných podmínek pěstování, sklizně a skladování nepředstavují pro konzumenty žádné riziko. Legislativní požadavek na maximální přípustný obsah glykoalkaloidů je stanoven také pro rajčata. Přípustné jsou hladiny do 200 mg/kg, vyjádřené jako suma α -solaninu, α -chaconinu a α -tomatinu v rajčatech. Kromě již zmíněných hlavních glykoalkaloidů brambor (α -solaninu a α -chaconinu) se v kulturních odrůdách nacházejí i minoritní zástupci, jedná se např. o β -solanin, β -chaconin, γ -solanin, γ -chaconin, α - a β -solamarin. Tyto glykoalkaloidy mohou v některých planých druzích brambor tvořit podstatnou část z celkových glykoalkaloidů. Také v rajčatech se kromě majoritního α -tomatinu vyskytují minoritní glykoalkaloidy jako β -tomatin, γ -tomatin a δ -tomatin.

Kalysteginy byly identifikovány v nedávné době a zatím chybí dostatečné množství dat pro objektivní posouzení rizika plynoucího z příjmu těchto látek v dietě. Kalysteginy jsou strukturně podobné cukrům a jsou efektivní inhibitory glykosidáz. Tato vlastnost kalysteginů by mohla mít za následek různé poruchy a zdravotní potíže hospodářských zvířat i lidí. Na druhou stranu je tato vlastnost zkoumána za účelem léčení cukrovky, rakoviny nebo virových onemocnění.

2 ALKALOIDY

Za alkaloidy jsou považovány dusíkaté bazické sloučeniny (tvořící soli s kyselinami), které vznikají jako sekundární metabolity a vykazují v závislosti na konzumovaném množství různé biologické účinky. Patří mezi přirozené toxické látky rostlin.

Alkaloidy jsou heterogenní skupinou zahrnující více než 6000 sloučenin. Vyskytují se nejčastěji jako směsi látek příbuzné struktury v různých částech vyšších rostlin (semenech, listech, kořenech, kůře aj.). Některé se považují za produkty detoxikace, regulátory růstu a rezervní formy dusíku.¹

Alkaloidy se běžně klasifikují na 3 hlavní základní skupiny:¹

- pravé alkaloidy
- pseudoalkaloidy
- protoalkaloidy

Pravé alkaloidy jsou obvykle heterocyklické dusíkaté báze odvozené od aminokyselin.

Pseudoalkaloidy jsou také heterocyklické dusíkaté báze, ale jejich prekurzory nejsou aminokyseliny. Jsou obvykle méně toxické než pravé alkaloidy (např. solanin v bramborech). Jsou odvozeny od purinu nebo jsou to steroidní sloučeniny. Mezi steroidní sloučeniny patří steroidní glykoalkaloidy.

Protoalkaloidy jsou bazické aminy odvozené od aminokyselin, ale dusík není součástí aromatického (heterocyklického) systému¹ (např. kapsaicin v pálivých paprikách).

Z čeledi lilkovitých jsou alkaloidy obsaženy např. v rodu rulík (*Atropa* L.), který je v naší květeně zastoupen rulíkem zlomocným (*Atropa bella - donna* L.). Celá rostlina je jedovatá obsahem alkaloidů atropinu, skopolaminu, daturinu a hyoscyaminu. Rulík je prudce jedovatý a může dojít k otravě i při sbírání listů. Blín černý (*Hyoscyamus niger* L.) z rodu blín (*Hyoscyamus* L.) obsahuje alkaloidy hyoscyamin, atropin a skopolamin. Používá se v lékařství. Celá rostlina durmanu obecného (*Datura stramonium* L.), hlavně listy a semena, obsahuje alkaloidy obdobné jako předcházející dva druhy; toxické účinky jsou podobné jako u rulíku. Celá rostlina tabáku virginského (*Nicotiana tabacum* L.) obsahuje větší počet alkaloidů; základní jedovaté účinky má nikotin, atd.²

V následující kapitole budou popsány některé toxické látky patřící do skupiny alkaloidů. Detailní pozornost pak bude věnována látkám významným z hlediska potravního řetězce člověka a to steroidním glykoalkaloidům a nortropanovým alkaloidům kalysteginům.

2.1 Vlastnosti alkaloidů

Název alkaloidy je odvozen do jejich slabě alkalické reakce. Jako alkaloidy označujeme všeobecně organické dusíkaté báze, vyznačující se zpravidla silnými farmakologickými účinky. Díky své slabě alkalické povaze jsou v rostlinách obvykle vázány jako soli organických kyselin (kyseliny šťavelové, octové, mléčné, jablečné, vinné, citronové, mekonové a pod.); jen málo alkaloidů je přítomno v rostlinách jako volné báze. Po chemické stránce se jedná o organickou sloučeninu obsahující jeden nebo více atomů dusíku. Většina alkaloidů jsou látky pevné, bezbarvé, bez zápachu, při vyšších teplotách a za obvyčejného tlaku se obvykle rozkládají. Jen málo alkaloidů jsou látky tekuté (koniin, nikotin, spartein); vyznačují se charakteristickým zápachem a lze je destilovat. Přirozené alkaloidy jsou často opticky aktivní. Pouze některé alkaloidy se rozpouštějí snadno ve vodě; jsou však zpravidla dobře rozpustné v alkoholu, chloroformu, etheru a ve směsi chloroformu s etherem. Také některá organická rozpouštědla základního charakteru jsou vhodnými rozpouštědly alkaloidů (anilin, pyridin, piperidin). Soly alkaloidů se rozpouštějí ve vodě velmi snadno, podobně v alkoholu, naproti tomu jsou obtížně rozpustné v organických rozpouštědlech, jež se s vodou nemísí. Triviální názvy alkaloidů jsou nejčastěji odvozeny od názvu rostliny ze které byly poprvé izolovány. Většina rostlinných alkaloidů má různě specifický účinek na lidský organizmus.

2.2 Výskyt alkaloidů

Alkaloidy se nacházejí ve vyšších, dvouděložných rostlinách, menší mírou v jednoděložných rostlinách (čeleď Liliaceae). Byly vyizolovány také z některých nahosemenných rostlin, příkladem je rod *Taxus* a *Ephedra*. Jejich přítomnost byla také prokázána v některých kapradinách a plavuních (*Lycopodium*), v přesličkách (*Equisetum*) a v houbách (*Claviceps purpurea*, *Psilocybe*).

Doposud se našlo okolo 6000 alkaloidů v rostlinných druzích, předpokládá se, že přibližně 10 až 20 % všech rostlin obsahuje alkaloidy.

Některé alkaloidy jsou taxonomicky velmi rozšířené. Příkladem může být nikotin, který se vyskytuje v rostlinách čeledí Solanaceae, Equisetaceae, Lycopodiaceae, Crassulaceae, Asclepiadaceae atd. Naopak velmi málo rozšířené jsou alkaloidy s velmi složitou strukturou např. morfinanového typu. Nacházejí se v rostlinách rodu Ranales a Papaverales. Samotný morfin se vyskytuje pouze u druhů *Papaver somniferum* a *Papaver setigerum*. Strychnin se nachází pouze v rodě *Strychnos* (Loganiaceae). Obyčejně se v jedné rostlině vyskytuje více alkaloidů, přičemž alkaloid vyskytující se v největším množství je označován jako hlavní, ostatní jsou vedlejší alkaloidy.

V jednotlivých rostlinách a druzích můžeme rozlišit kvalitativní a kvantitativní rozdíly v zastoupení alkaloidů, což je vyvoláno vnějšími vlivy působící na rostlinu (klima, prostředí, složení půdy atd.), podstatné rozdíly jsou však dány genetickými znaky utvořenými šlechtěním. Příkladem je nikotin v rostlinách rodu *Nicotina*.

Z našich jedovatých rostlin patří mezi alkaloidní rostliny např. tyto: *Aconitum anthora*, *A. lycoctonum*, *A. napellus*, *A. variegatum*, *Aethusa cynapium*, *Atropa bella-donna*, *Berberis vulgaris*, *Buxus sempervirens*, *Chaerophyllum temulum*, *Chelidonium majus*, *Colchicum autumnale*, *Colutea arborescens*, *Conium maculatum*, *Consolida ajacis*, *Corydalis cava*, *C. solida*, *Cynoglossum officinale*, *Datura stramonium*, *Delphinium elatum*, *D. oxysepalum*, *D. staphisagria*, *Ephedra distachya*, *Equisetum palustre*, *Fritillaria imperialis*, *F. meleagris*, *Fumaria officinalis*, *Helleborus faetidus*, *H. niger*; *H. viridis*, *Hydrastis canadensis*, *Hyoscyamus niger*, *Laburnum anagyroides*, *Lobelia dortmanna*, *L. inflata*, *Lolium remotum*, *L. temulentum*, *Lupinus albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. perennis*, *L. polyphyllus*, *Lycium halimifolium*, *Narcissus poeticus*, *N. pseudonarcissus*, *Nicandra physaloides*, *Nicotiana rustica*, *N. tabacum*, *Papaver rhoeas*, *P. somnifeyum*, *Sarothamnus scoparius*, *Scopolia carniolica*, *Senecio jacobaea*, *Solanum dulcamara*, *S. nigrum*, *S. tuberosum*, *Taxus baccata*, *Yeratrum album* a *Y. nigrum*.

Alkaloidy se nalézají v různých orgánech rostlin (kořeny, plody, semena a pod.). Velké množství alkaloidů mají zástupci čeledí *Apocynaceae*, *Asclepiadaceae*, *Berberidaceae*, *Loganiaceae*, *Menispermaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*, *Rubiaceae*, *Solanaceae*.

Alkaloidy nemají prakticky vůbec *Lamiaceae* a *Rosaceae*. U rostlin výtrusných a u hub se alkaloidy vyskytují zřídka. Nepřehlédneme-li k námeli (*Secale cornutum*), jsou u nich pouze jednoduše stavěné acyklické a karbocyklické báze. Také u rostlin nahosemenných alkaloidy zpravidla chybějí; u nich je znám pouze taxin (*Taxus baccata*) a efedrin (*Ephedra sinica* aj.). Poněkud hojněji jsou alkaloidy zastoupeny u rostlin jednoděložných, především u zástupců čeledi *Liliaceae*. Často se vyskytuje v jedné rostlině více alkaloidů, jež jsou mezi sebou vždy chemicky příbuzné. Kolísání obsahu alkaloidů u jednotlivých alkaloidních rostlin je překvapivě veliké.

Význam alkaloidů pro rostlinu dosud není jednoznačně objasněn. Existují dohady, že prudký fyziologický účinek alkaloidů chrání rostlinu před býložravci a parazity. Toto ovšem platí pouze v některých případech.

2.3 Účinky alkaloidů

Pro velkou rozmanitost chemických struktur musíme očekávat, že strukturně velmi podobné alkaloidy se liší v účinku (např. atropin a kokain), naopak strukturně vzdálené sloučeniny se mohou účinkem velmi podobat (např. pilokarpin a muskarin).

Ke skupině alkaloidů můžeme také zařadit velké množství návykových látek. Z hlediska objemu je na prvním místě morfin získávaný ze šťávy nezralých makovic. V medicíně se používá k tlumení bolesti. Methyloací lze získat kodein, který má vhodnější léčebné účinky. Pokud dojde k acetylacii obou hydroxylových skupin morfinu, vzniká jedna z nejnebezpečnějších drog - heroin. V plodech blínu, durmanu a rulíku se vyskytuje atropin, který se v lékařství používá k tlumení křečí hladkého svalstva a v očním lékařství k rozšiřování zornic. Dalším známým alkaloidem je chinin, který je lékem proti malárii. Mezi další účinky patří snižování teplot. Mezi námelové alkaloidy patří ergometrin používaný v gynekologii a ergotamin, který se užívá k léčbě poruch útrobního nervstva a bolestí, které jsou podmíněny cévně (migrény). Kofein izolovaný ze zrnků kávy či lístků čaje povzbuzuje nervovou soustavu a srdeční činnost. Mezi extrémně jedovaté alkaloidy patří kurare, tzv. šípový jed, izolovaný z některých druhů jihoamerických rostlin. Mezi látky s vysokou toxicitou můžeme také zařadit strychnin a brucin izolovaný z jihoamerického stromu kulčiba. Obě tyto látky mají neurotoxické vlastnosti.

2.4 Toxikologicky nejvýznamnější skupiny alkaloidů

Chinolizidinové - Chemicky jsou to deriváty norlupinanu. V rostlinné říši se vyskytují značně rozptýleny. Toxikologicky jsou velmi významné alkaloidy cytisin, spartein a jim podobné, nacházející se v čeledi bobovitých (*Fabaceae*).

Piperidin-pyridinové - Příkladem piperidinového alkaloidu je vysoce toxický koniin z bolehlavu plamatého (*Conium maculatum*), který vzniká pro alkaloidy atypicky, cestou acetátové syntézy a nikoli z aminokyseliny. Další zajímavé látky této skupiny jsou pyridinové alkaloidy tabáku (*Nicotina*) - nikotin a anabasin. Nikotin vzniká z aminokyseliny ornithinu a nikotinové kyseliny (jejími prekursory jsou glycerol a asparagová kyselina). Anabasin je syntetizován z lysinu a nikotinové kyseliny. K této skupině alkaloidů patří také terapeuticky významný lobelin z lobelky (*Lobelia*), arekolin z arekové palmy (*Areca catechu*). Někdy se pod tuto skupinu zahrnují i tropanové alkaloidy (zde uvedeny níže). Biogeneze těchto látek začíná u ornithinu, který dává vznik cyklickému pyrolidinovému derivátu.

Tropanové alkaloidy - Jsou typickými alkaloidy rostlin čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Biogeneze těchto látek vychází právě z výše uvedeného cyklického pyrolidinového derivátu (až po sem je syntéza shodná s výše uvedenou skupinou), kondenzací s třemi acetátovými jednotkami vzniká alkohol tropanol. Estery tohoto alkoholu s kyselinami (tropová, mandlová, benzoová) - hyoscyamin, jeho racemát atropin a epoxidovaný derivát skopolamin. Do této skupiny patří i známá návyková látka - alkaloid kokain získaný z jihoamerické rostliny rudodřevu koka (*Erythroxylon coca*).

Pyrolizidinové alkaloidy - Patří do široké skupiny přírodních toxinů, které se vyskytují ve 3% všech kvetoucích rostlin, léčivých i plevelných, v květech i plodech 6000 druhů rostlin z 13 čeledí (*Brutnákovité - Boraginaceae, Hvězdicovité - Asteraceae, Bobovité - Fabaceae., Řešetlákovité - Rhamnaceae, Otočnickovité - Heliotropiceae ...*). Jejich obsah se většinou pohybuje v rozmezí 0,1-1 % sušiny. Jedná se o komplexní směs, v jedné rostlině se často vyskytuje více než 10 různých sloučenin. Nejtoxičtější jsou esterifikované alkaloidy mající 1,2 - dvojnou vazbu, nicméně samotné poškození tkání způsobují až metabolity alkaloidů produkované jaterními mikrozomálními enzymy. Jde pravděpodobně o dehydro- nebo pyrolové formy popř. vznikající dehydroaminoalkoholy. Jsou silnými alkylačními činidly.

Toxicita chronická se projevuje po dlouhodobém zkrmování nízkých dávek (domácí zvířata) jako fibrotické jaterní poškození a akutní toxicita je charakterizována jaterní nekrózou.

Těmto alkaloidům je připisována také sekundárně fotosenzibilizující aktivita. Některé poškozují chromozómy a jsou karcinogenní. Nejznámější jsou alkaloidy starčku (*Senecio*) (senecionin, senecyfilin, retrorsin), kostivalu (*Symphytum*), podbělu (*Tussilago*), devětsilu (*Petasites*), brutnáku (*Borago*), užanky (*Cynoglossum*) a kamejky (*Lithospermum*).

Do potravního řetězce pyrrolizidinové alkaloidy vstupují kontaminací osiva zaplevelením (obilí), toxické rostliny jsou používány pro výrobu potravních doplňků a tradičních léčivých prostředků, čajů, přípravků tradiční medicíny. Do živočišných produktů přecházejí intoxikací hospodářských zvířat (vejce, mléko) krmivem (pícniny), do medu se dostávají z pylu toxických rostlin. Jedná se o látky toxické pro člověka i hospodářská zvířata, karcinogenita byla prokázána na zvířatech

Izochinolinové - Jsou to především toxické látky makovitých rostlin (*Papaveraceae*) - morfin, papaverin, chelerythrin, bulbokapnin apod., alkaloidy hlavěnky dávivé (*Uragoga ipecacuanha*) a dalších terapeuticky a toxikologicky významných rostlin. Biosyntéza, přes značné strukturální rozdílnosti konečných metabolitů, společně vychází z fenylalaninu nebo tyrosinu a směřuje přes důležité meziproducty norlaudanolin a retikulin k benzylisochinolinovým a aporfinovým strukturám isochinolinových alkaloidů.

Alkaloidy s exocyklickým dusíkovým atomem - Do této skupiny patří především skupina alkaloidů ocúnu (*Colchicum*) - kolchicin, demekolcin apod. Alkaloidy této skupiny mají biogenezi podobnou jako izochinolinové alkaloidy. Kolchicin leč s velmi specifickou strukturou, má také biosyntetický základ ve fenylalaninu a tyrosinu, meziproductem při jeho syntéze je isochinolinový alkaloid autumnalin.

Indolové - Asi čtvrtina alkaloidů má za základ chemické struktury indol. Tento je zabudován buď v jednoduchých molekulách, jakou má gramin, psilocin, psilocybin anebo v složitějších strukturách "komplexních alkaloidů" typu aspidosperminu, korynanteinu či ibogainu, kdy do biogeneze látek je kromě aminokyselin a z nich vznikajícího indolového cyklu zapojena i monoterpenická jednotka loganin nebo sekologanin. Ještě složitější strukturu vykazují deriváty lysergové kyseliny - námelové alkaloidy (ergometrin, ergotamin, ergokristin apod.). S většinou vyšších rostlin, které je obsahují se však v naší flóře nesetkáme, z našich

přírodních zdrojů je obsahuje hlavně houba paličkovice nachová (*Claviceps purpurea*). Indolové alkaloidy představují velmi rozsáhlou a terapeuticky dobře využitelnou skupinu sekundárních metabolitů a tak intoxikace u nás hrozí spíše po nesprávném dávkování léčiv s jejich obsahem. Výjimkou je náš domácí barvínek z čeledi *Apocynaceae* a dále řada trav, které jsou hostiteli hub produkujících indolové alkaloidy (chrastíce, jílek, lesknice).

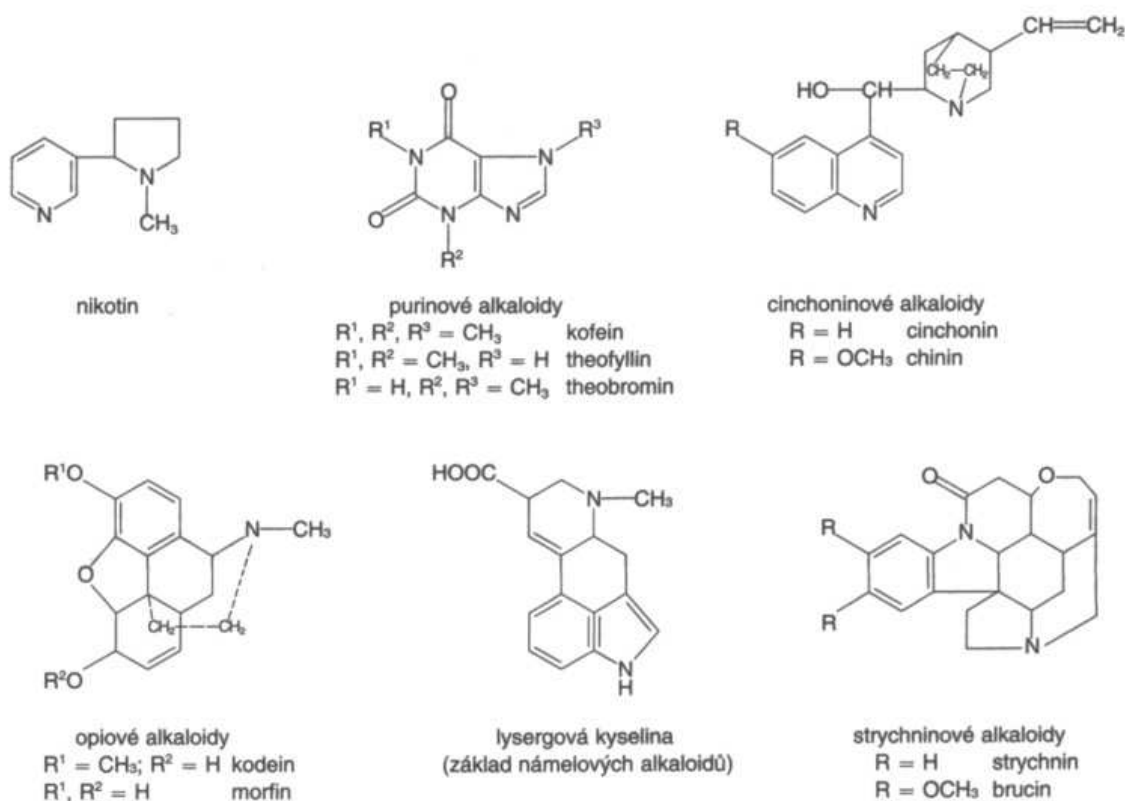
Steroidní - Řadíme k nim cholestanové glykoalkaloidy lilku (*Solanum*) solanin, tomatin, solasodin či alkaloid solanidin (tento již molekulu sacharidu neobsahuje), toxické metabolity kýchavice (*Veratrum*) a komonky (*Petilium*) - jervin, cyklopamin, cykloposin, protoveratryny atd., pregnanové alkaloidy zimostřázu (*Buxus*) - cyklobuxin, cyklobuxoviridin, buxtauin. Některé z těchto látek jsou teratogeny, inhibitory acetylcholinesterasy a podobně jako saponiny - destruktory buněčné membrány. O některých těchto látkách bude podrobně pojednáno v kapitole „Steroidní glykoalkaloidy“.

Terpenické - Do této skupiny jsou řazeny polyesterifikované norditerpeny, mající ve své molekule methylovaný nebo ethylovaný dusík (tzv. alkaminy). Patří k nim vysoce toxické metabolity oměje (*Aconitum*) a stračky (*Delphinium*) - akonitin, mezakonitin, ajacin.

Deriváty kyseliny antranilové - alkaloidy routy (*Ruta*) graveolin a skiamianin, způsobující kožní alergie.

Fenylalkylaminy - do této skupiny patří například jednoduchý amin efedrin z chvojníku (*Ephedra*) a nebo další (psychoaktivní) alkaloid mezkalin produkovaný několika rody kaktusů (např. *Trichocereus*, *Lophophora*). Syntéza těchto látek vychází z fenylalaninu.

Struktura některých alkaloidů je uvedena na Obrázku 1.

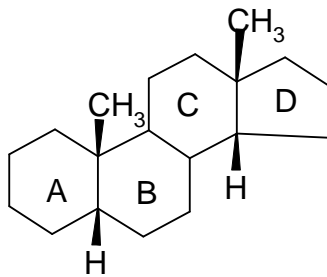


Obrázek 1 Struktura vybraných alkaloidů

2.5 Steroidní glykoalkaloidy

Od objevu jedovaté dusíkaté báze v bobulích lilku černého (*Solanum nigrum* L.) v roce 1820 bylo popsáno více než 80 steroidních aglykonů odvozených od cholestanu, které se volně nebo vázané s různými sacharidy nacházejí asi v 350 druzích rostlin čeledi lilkovité (*Solanaceae*) a liliovitě (*Liliaceae*). Vzhledem k objemu spotřeby potenciálních zdrojů a k počtu popsaných případů postižení konzumentů byla věnována v posledních 30 letech značná pozornost alkaloidům právě u rostlin těchto dvou čeledí, z nich mnohem méně u čeledi liliovitých.²

Dusíkaté steroidní glykoalkaloidy (nazývané také steroidní alkaminy) jsou charakteristické pro dvouděložné rostliny čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Základní skelet mají odvozený od cholestanu (α -cholestanu), který se skládá ze tří kondenzovaných šestičlenných kruhů a jednoho pětičlenného kruhu (struktura znázorněna na Obrázku 2).¹



Obrázek 2 Vzorec cholestanu

Chemická struktura glykoalkaloidů je tvořena aglykonem (nepolární lipofilní část molekuly) a na něj navázaným glykosidem (cukerná polární část molekuly).²

Ve více než 300 druzích rostlin rodu *Solanum* se nachází minimálně 90 různých steroidních glykoalkaloidů, které se podle struktury aglykonu dělí na 5 skupin:¹

- solanidany
- spirosolany, spiroaminoketaly
- 22,26-epiminocholstany
- α -epiminocyklohemiketaly
- 3-aminospirostany

V potravinářsky významných rostlinách se nacházejí glykoalkaloidy, jejichž aglykony jsou 3β -hydroxyderiváty odvozené od solanidanu nebo od spirosolanu. Derivátem solanidanu je solanidin a demissidin, od spirosolanu jsou odvozeny solasodin, tomatidenol a tomatidin.

Hlavními sloučeninami v rostlinách jsou glykosidy, které jsou doprovázeny malým množstvím volných aglykonů. Cukry (lineární a rozvětvené tetrasacharidy, trisacharidy a také di- a monosacharidy) jsou na aglykony vázány prostřednictvím hydroxylové skupiny v poloze C-3.

Spirosolany solasodin, tj. (25R)-stereoisomer, či tomatidenol, tj. (25S)-stereoisomer, se nacházejí v divokých odrůdách brambor a v odrůdách získaných křížením s divokými odrůdami (např. *S. berthaultii* a *S. vernei*). Vzájemně se liší pouze polohou heterocyklického dusíku.

Solasodin se vyskytuje jako glykosid α -solasonin obsahující trisacharid β -solatriosu stejně jako u α -solaninu. Tento glykosid se nachází také u lilku (baklažánu). Stejný aglykon je

i v α -solamarginu, který obsahuje α -chakotriosu stejně jako α -chaconin. Oba glykosidy se nacházejí např. u druhů *S. berthaultii* a *S. vernei*.

Tomatidenol je v bramborech přítomen jako steroidní glykosid α -solamarin s vázanou β -solatriosou nebo jako β -solamarin s vázanou β -chacotriosou. Většina odrůd brambor obsahujících solamariny pochází z odrůdy *S. demissum*. V rajčatech β -glykosid tomatidenol nazývaný dehydrotomatin zřejmě doprovází α -tomatin. Obsahuje lykotetraosu tak jako α -tomatin.¹

Čisté glykoalkaloidy jsou bílé krystalické látky. Jsou omezeně rozpustné ve vodě, methanolu, ethanolu a dalších polárních rozpouštědlech v závislosti na pH roztoku. α -tomatin je rozpustný v alkoholu, methanolu a nerozpustný v etheru. Tomatidin je rozpustný v ethylacetátu.³

Glykoalkaloidy jsou značně termostabilní sloučeniny. K termické degradaci nedochází dokud teplota nedosáhne 230 až 280 °C. Absorpční maximum těchto látek v UV oblasti je při 200 - 210 nm.⁴

2.5.1 Glykoalkaloidy brambor

Vzhledem k objemu produkce a pravidelné spotřebě jsou nejvýznamnějším zdrojem glykoalkaloidů v lidské výživě brambory (Tabulka I).

Alkaloidy obsažené v bramboru bývají často uváděny pod společným názvem solanin, který však není jednou látkou, ale označuje se tak skupina velmi příbuzných glykoalkaloidů. Těchto sloučenin je známo přes 20, z toho 10 bylo zjištěno v bramboru.²

Tabulka I Nejvýznamnější glykoalkaloidy izolované z listů nebo hlíz druhů *Solanum*⁵

Glykosid	Aglykon	Sacharidická část	Struktura
Solanidinové glycosidy			
α -solanin	solanidin	solatriosa	A: R-Gal<Rham/Glu
β -solanin	solanidin	solabiosa	B: R-Gal-Glu
γ -solanin	solanidin	galaktosa	C: R-Gal
A-chaconin	solanidin	chacotriososa	D: R-Glu<Rham-a/Rham-b
β_1 - chaconin	solanidin	chacobiosa	E: R-Glu-Rham-a
β_2 - chaconin	solanidin	chacobiosa	F: R-Glu-Rham-b
Γ - chaconin	solanidin	glukosa	G: R-Glu

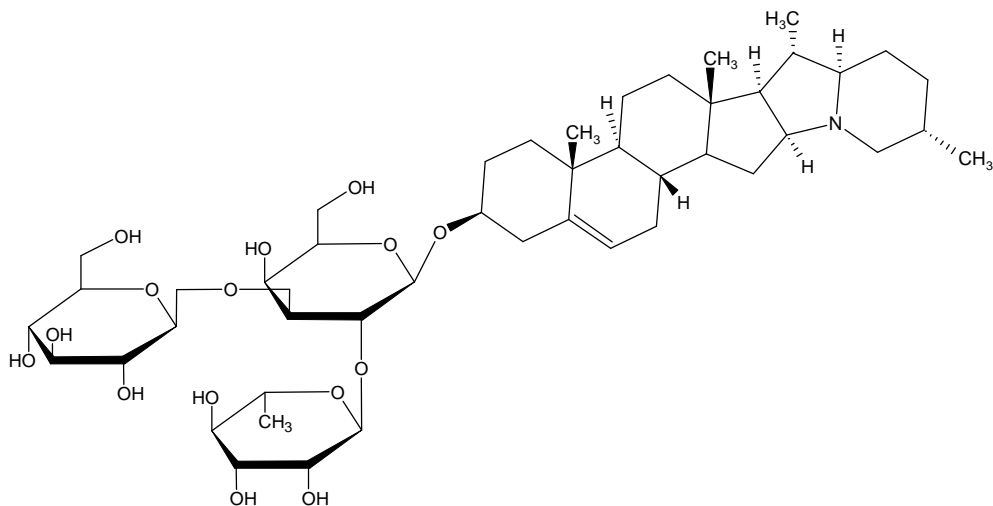
dehydrocommersonin	solanidin	commertetraosa	H: R-Gal-Glu<Glu/Glu
Demissidinové glykosidy			
demissin	demissidin	lycotetraosa	I: R-Gal-Glu<Glu/Xyl
commersonin	demissidin	commertetraosa	Jako H
Leptinidinové glykosidy			
Leptinin I	leptinidin	chacotriosa	Jako D
leptinin II	leptinidin	solatriosa	Jako A
Acetylleptinidinové glykosidy			
leptin I	acetylleptinidin	chacotriosa	Jako D
leptin II	acetylleptinidin	solatriosa	Jako A
Tomatidenolové glykosidy			
α -solamarin	tomatidenol	solatriosa	Jako A
β -solamarin	tomatidenol	chacotriosa	Jako D
Solasodinové glykosidy			
solasonin	solasodin	solatriosa	Jako A
solamargin	solasodin	chacotriosa	Jako D
Tomatidinové glykosidy			
α -tomatin	tomatidin	lycotetraosa	Jako I
sisunin (neotomatin)	tomatidin	commertetraosa	Jako H

R = aglykon; Gal = galaktosa; Glu = glukosa; Rham = rhamnosa; Xyl = xyloza

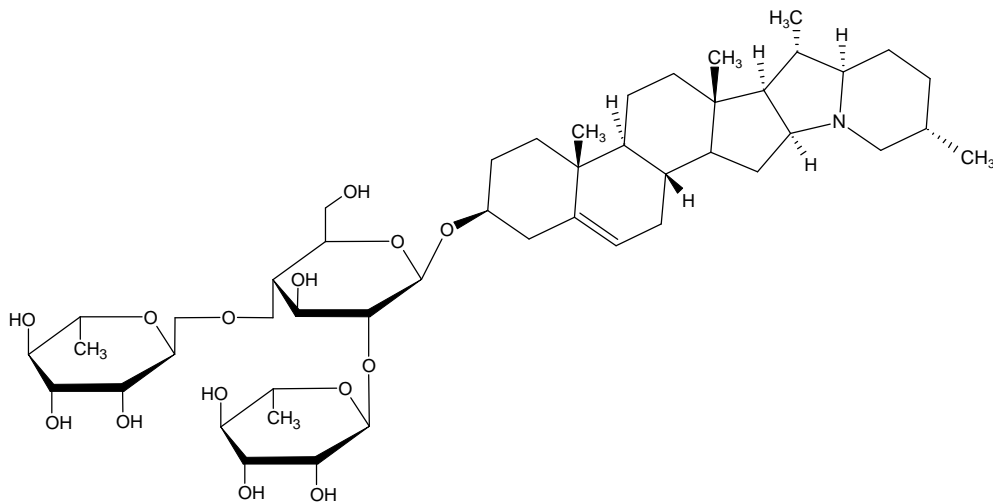
Symbol “<” v charakteristice struktury sacharidické části znamená, že na substituovaný sacharid se váží dva další sacharidy (oddělené “/“).

Solanin byl poprvé u bramboru zmíněn v r. 1826.^{2,6} Teprve v r. 1954 při snaze o frakcionaci solaninu byl objeven chaconin.^{2,7} Fakt, že solanin má aglykon solanidin bylo popsáno v r. 1861.^{2,8}

V případě konzumních brambor (odrůd rodu *Solanum tuberosum*) tvoří přibližně 95 % všech přítomných toxických glykoalkaloidů dva hlavní glykoalkaloidy α -solanin a α -chaconin (jejich struktury jsou znázorněny na Obrázku 3).² Tyto dvě látky, které se dříve nazývaly solanin, mají shodný aglykon solanidin a liší se pouze ve složení glykosidu. Cukrem vázaným v α -solaninu je β -solatriosa, v α -chaconinu je vázána β -chacotriosa.¹ Solanin je hořký, jedovatý glykoalkaloid (C₄₅H₇₃NO₁₅), mající omamující vlastnosti. Dříve byl používán k léčbě epilepsie.²



α -solanin



α -chaconin

Obrázek 3 Struktura α -solaninu a α -chaconinu

Glykoalkaloidy ovlivňují sensorické vlastnosti brambor, při běžných koncentracích (20 – 100 mg/kg) spoluvytvářejí typickou chuť a vůni vařených nebo jinak tepelně upravených brambor.⁹

Glykoalkaloidy jsou součástí ochranných mechanismů rostliny a vyskytují se ve všech jejích částech (Tabulka II). V rostlině jsou rozloženy nerovnoměrně.¹⁰ Nejvyšší hladiny jsou v pletivech s vysokou metabolickou aktivitou, zvláště v květech, klíčcích, plodech, kořenech a listech.⁴ Pokud jde o hlízy, nejvyšší koncentrace alkaloidů je pod slupkou a zvyšuje se pokud jsou brambory na světle. Vyšší obsah alkaloidů lze nalézt v okolí oček (pupeny na hlíze) a v blízkosti poranění hlízy.¹²

Tabulka II Hladiny glykoalkaloidů v jednotlivých částech rostliny *Solanum tuberosum*¹¹

Část rostliny	Obsah (mg/kg č.hm.)
Klíčky	2000-4000
Kořeny	180-400
Lodyha	20-30
Listy	400-1000
Květy	3000-5000
Bobule	4200
Celá hlíza	10-180
Dřeň	12-50
Svrchní část hlízy (3-5%)	300-600
Svrchní část hlízy (10-15%)	150-300
Slupka s očky	300-500

Pro zemědělství je nejdůležitější obsah glykoalkaloidů v hlízách, kde je nejvyšší koncentrace v povrchových vrstvách a směrem do středu klesá. Množství glykoalkaloidů je především závislé na odrůdě. Na obsah má vliv také řada dalších faktorů. Významný vliv má lokalita pěstování, klimatické podmínky, fyziologická zralost hlízy, způsob hnojení a závlaha. Zvýšená syntéza je spojena také se stresujícími podmínkami např. napadení škůdci, mechanickým působením a také způsobem uskladnění hlíz, kde nepříznivě působí vlhkost, světlo, teplota či klíčení během skladování.⁴ Působením světla dochází k tzv. zelenání hlízy, což souvisí se syntézou chlorofylu. Současně se zvyšuje hladina glykoalkaloidů. Obsah alkaloidů však nemusí s barvou přímo korelovat.

V obvykle používaných odrůdách brambor jsou glykoalkaloidy přítomny v nízkých koncentracích. Jejich obsah v hlízách je ovlivňován klimatickými vlivy, půdou a agrotechnickými zásahy. Hlízy vypěstované na suchých a teplých stanovištích zpravidla obsahují více solaninu.¹⁰ Hlízy stejných odrůd z chladnějších poloh s vyššími srážkami mají zpravidla obsah glykoalkaloidů nižší. Obsah roste s rostoucími dávkami dusíkatých hnojiv.

Vlivem rozdílných podmínek růstu, zralosti hlíz, případně mechanickým poškozením může dojít k jejich akumulaci.¹²

Hladiny glykoalkaloidů se mohou rovněž značně lišit u jednotlivých odrůd. V posledních letech se věnuje stále více pozornosti zdravotním rizikům z přírodních toxických látek obsažených v kulturních rostlinách, mezi než patří i glykoalkaloidy. V zákoně o potravinách ČR je pro brambory uvedeno nejvyšší přípustné množství glykoalkaloidů 200 mg/kg. Je proto třeba sledovat hladiny toxických glykoalkaloidů zejména v nových odrůdách brambor a k těmto údajům přihlídnout při testování a registraci nových odrůd.

Právě proto je obsah glykoalkaloidů jednou z vlastností, která se sleduje během šlechtění. Šlechtitelé se snaží nepřekročit hladinu glykoalkaloidů 100 mg/kg. Nicméně i u moderních odrůd s hladinou glykoalkaloidů pod 100 mg/kg může po osvětlení dojít ke zvýšení na 1000 i více mg/kg. Při běžně udávané nebezpečné dávce 200 mg glykoalkaloidů to znamená, že dospělý člověk může pozřít tuto zdraví nebezpečnou dávku v jedné větší zelené bramboře či v cca 1 kg zdravých brambor. Hlízy brambor je proto nutno skladovat ve tmě, v suchu a chladu, nikoli však mrazu. Ideální podmínky jsou při teplotě 3 až 4 °C a relativní vlhkosti vzduchu kolem 55 %. Důležité je také dobré větrání. Vyšší teploty vedou k předčasnému klíčení brambor, které je doprovázeno zvyšováním obsahu jedovatých glykoalkaloidů v hlízách. Naopak mráz ničí hlízy, ve kterých pak dochází k hydrolýze škrobu na nízkomolekulární oligosacharidy; poškozené hlízy pak snadno podléhají hnilobě. Pro zabránění předčasnému klíčení a současně i k ničení spor plísní se v některých zemích užívá radioaktivního ozařování brambor.

Pro praxi bylo formulováno několik doporučení, mj. do sortimentu pěstovaných odrůd vybírat především odrůdy s nižším až maximálně středním obsahem glykoalkaloidů a zohledňovat povětrnostní podmínky vegetace. Vzhledem k potenciálním zdravotním rizikům sledovat endogenní toxické látky v potravinách. Při pěstování brambor dodržovat správnou agrotechniku, včetně posklizňové úpravy hlíz, skladování a expedice. Porosty nepřehnojovat dusíkem, dodržovat zahrnutí hlíz při kultivaci pro zabránění zelenání hlíz, sklízet hlízy určené pro konzum až po fyziologickém dozrání, zabránit mechanickému poškození při sklizni a při posklizňové úpravě, v přechodných skládkách nevystavovat hlízy světlu, skladovat je při optimální teplotě a expedovat hlízy ve vhodných obalech při zkrácení světelné expozice.¹³

Koncentrace glykoalkaloidů v produktech z brambor závisí na jejich obsahu v původní surovině. Přestože jsou glykoalkaloidy značně termostabilní (odolávají mražení i sušení, nerozkládají se vařením, pečením ani mikrovlnným ohřevem) dochází v průběhu technologického a kulinárního zpracování k částečnému snižování jejich hladin jak uvádí⁴ Tabulka III. Při teplotách nad 170 °C se tyto látky částečně rozkládají. Poměrně značný podíl glykoalkaloidů (okolo 50 %) lze odstranit loupáním.¹ Při vaření brambor ve vodě dochází k jejich úbytku výluhem, neboť jsou ve vodě rozpustné. K výraznému snížení celkového obsahu glykoalkaloidů dochází při výrobě bramborových lupínků, a to v důsledku vyplavení škrobu (a s ním i značné části glykoalkaloidů) z hlíz nakrájených na tenké plátky.⁴ Ani při smažení nedochází k destrukci glykoalkaloidů, ale v důsledku úbytku vody se zvyšuje jejich relativní obsah v potravíně. Působením hydroláz nebo v kyselém prostředí probíhá hydrolýza glykoalkaloidů za vzniku aglykonu a cukerného zbytku. Aglykon je stabilní.¹

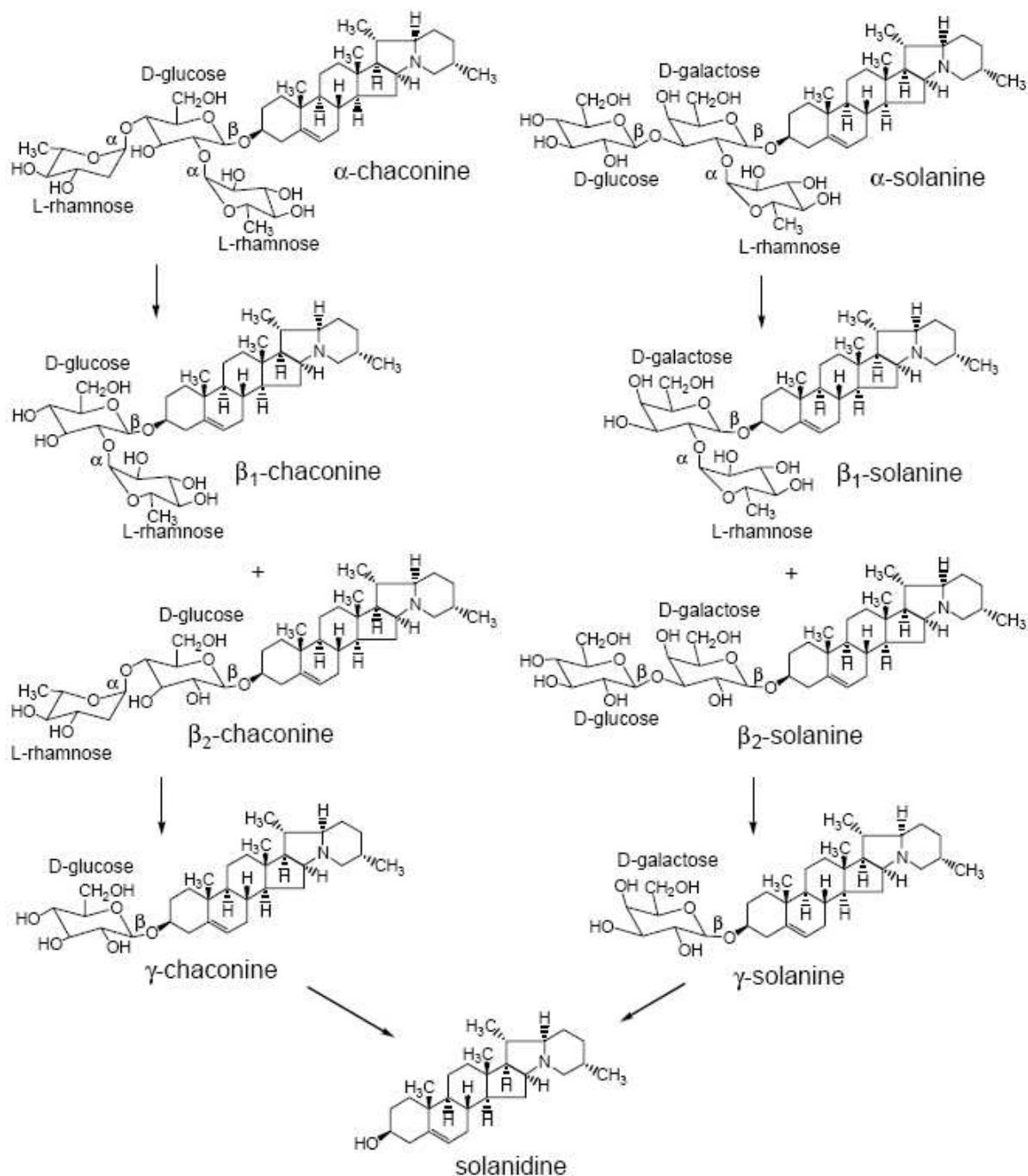
Tabulka III Změny hladin glykoalkaloidů během technologického a kulinárního zpracování brambor⁴

Proces zpracování hlíz	Průměrný obsah celkových GA v % (100 % odpovídá syrovým hlízám)
vaření ve slupce	75,2
vaření bez slupky	44,3
bramborové hranolky	53,9
bramborové lupínky	23,4

Kromě již zmíněných hlavních glykoalkaloidů brambor (α -solaninu a α -chaconinu) se v kulturních odrůdách nacházejí i minoritní zástupci, jedná se např. o β -solanin, β -chaconin, γ -solanin, γ -chaconin, α - a β -solamarin. Tyto glykoalkaloidy mohou v některých planých druzích brambor tvořit podstatnou část z celkových glykoalkaloidů.¹

Parciální kyselou hydrolýzou vznikají z α -solaninu a α -chaconinu přibližně v ekvimolárním množství nejprve příslušné β_1 - a β_2 -glykosidy, z nich vzniká γ -glykosid a konečným produktem hydrolýzy je aglykon solanidin, který je prakticky stabilní. Stejně produkty by mohly vznikat také v trávicím traktu.^{1,14} Hydrolýza probíhá v prostředí

0,25 M HCl při 60 °C. Glykoalkaloidy jsou následně vysráženy pomocí vodného roztoku NH_3 .¹⁴ Průběh hydrolyzy znázorňuje Obrázek 3.



Obrázek 3 Hydrolyza α -solaninu a α -chaconinu

V divoce rostoucích bramborách se kromě solaninu a chaconinu nachází řada dalších glykosidů s jinými aglykony (např. leptiny, leptininy, kommerisonin a demissin).¹

2.5.1.1 Toxicita glykoalkaloidů brambor

Mechanismus toxického účinku glykoalkaloidů spočívá v inhibici enzymu acetylcholinesterázy centrálního nervového systému a ve schopnosti narušovat membrány zažívacího traktu a některých orgánů. Při předávkování může dojít i ke smrtelné otravě, nicméně otravy bramborami jsou vzácné. Pokud k nim dojde, jedná se zpravidla o případ, kdy dítě snědlo větší množství plodů (nikoliv hlíz), ovšem vzhledem k jejich nechutnosti a velkému počtu jde o velmi nepravděpodobnou událost.²

Typickými příznaky otravy jsou nevolnost, zvracení, průjem, žaludeční křeče, bolesti hlavy, závratě. Vysoké dávky mohou způsobovat halucinace, ztrátu citu, ochrnutí, horečku, žloutenku, rozšířené zornice a podchlazení, v některých případech bylo zaznamenáno bezvědomí a snížení tepového rytmu. Otrava solaninem ve vysokých dávkách může vyvolat smrt. Příznaky se vyskytnou obvykle po 8 až 12 hodinách po přijmutí, ale mohou se vyskytnout již 30 minut po zkonsumování potravy s vysokým obsahem solaninu. V pokusných studiích na laboratorních zvířatech byl prokázán teratogenní účinek glykoalkaloidů ve vysokých dávkách. α -solanin a α -chaconin mají v tomto ohledu synergistický účinek, který závisí do značné míry na jejich vzájemném poměru.^{15,3}

Toxicita glykoalkaloidů klesá v kyselém prostředí, vysoká je naopak v prostředí zásaditém. To pravděpodobně vyplývá ze skutečnosti, že v kyselém prostředí glykoalkaloidy nevytvářejí komplexy se steroly membrán.²

Denní příjem průměrného konzumenta se v evropských zemích pohybuje okolo 1 mg glykoalkaloidů na kg tělesné hmotnosti, přičemž již příjem 2 – 5 mg glykoalkaloidů/kg tělesné hmotnosti vyvolává příznaky otravy a letální dávka je 3 – 6 mg glykoalkaloidů/kg tělesné hmotnosti. Z důvodu absence údajů o chronické toxicitě nebyla dosud stanovena hodnota NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), a tedy ani hodnota přípustného denního příjmu ADI (Acceptable Daily Intake). Maximální přípustné množství MRL (Maximum Residue Limit) je ve většině zemí stanoveno na 200 mg GA/kg neloupaných brambor.^{15,3} V České republice stanovuje přípustné množství glykoalkaloidů vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 53/2002 Sb., a to ve výši (5/1) 200 mg/kg neloupaných hlíz. Nad

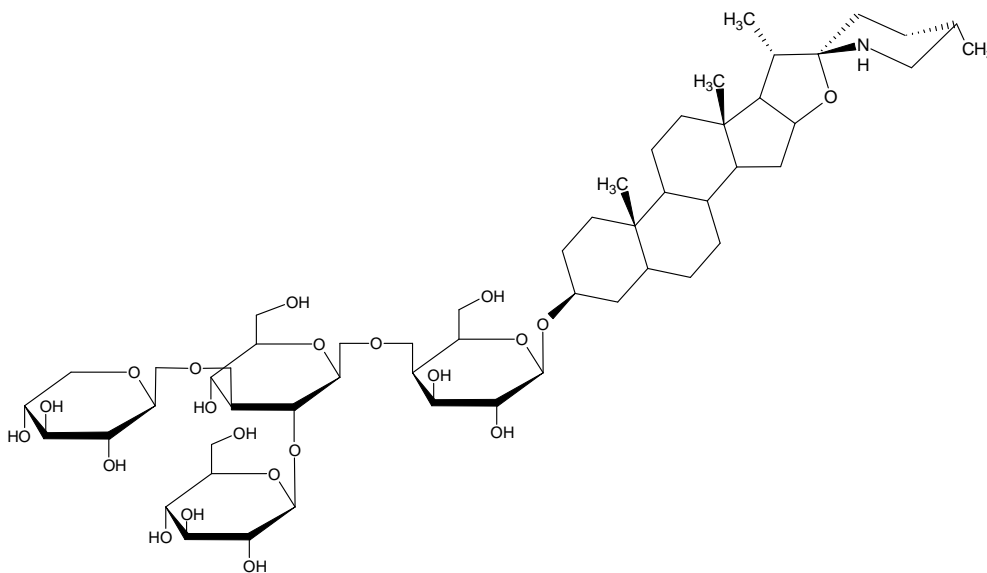
tuto hranici se potravinu pokládá za jinou než zdravotně nezávadnou. Uvedený zlomek (5/1) znamená, že z pěti posuzovaných vzorků je u jednoho možno tolerovat hodnotu vyšší, ale pouze o 50 % hodnoty přípustného množství.¹

2.5.2 Glykoalkaloidy rajčat

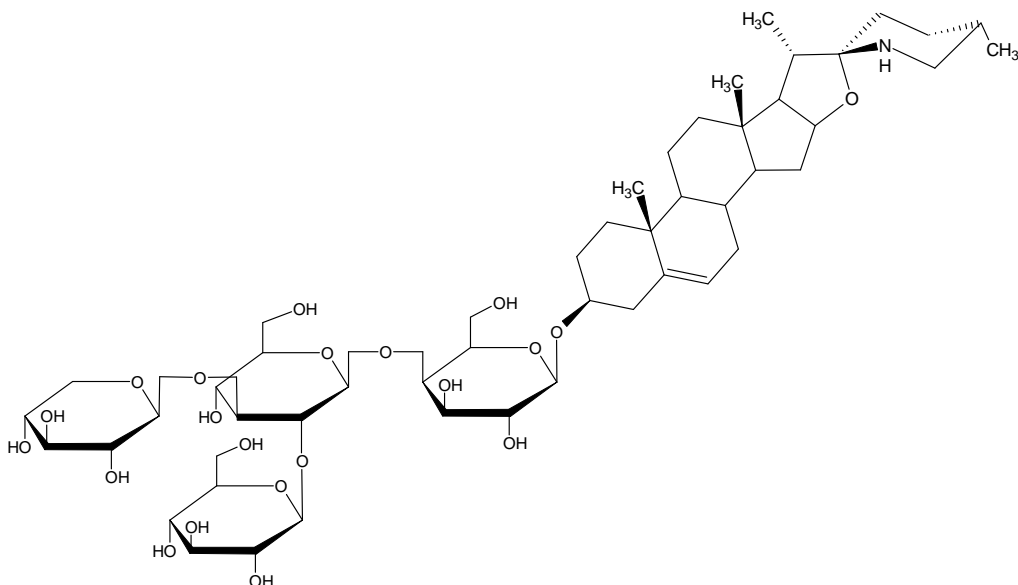
Glykoalkaloidy jsou obsaženy také v nezralých rajčatech (*Lycopersicon esculentum* L.), převládajícím glykosidem je α -tomatin.

Zelená rajčata nejsou ve světě běžnou konzervářskou surovinou, proto nebylo problematice alkaloidů rajčat dosud věnováno tolik výzkumných prací jako v případě bramborů.²

Glykoalkaloidy vyskytující se v rajčatech jsou odvozené od aglykonu spirosolanu. Hlavní glykoalkaloid vyskytující se v rajčatech je tomatin a minoritní složku tvoří dehydrotomatin (jejich struktury jsou znázorněny na Obrázku 4 a 5). Tomatin je tvořen aglykonem tomatidinem (nepolární lipofilní část molekuly), s navázanou cukernou polární složkou lykotetraosou, která se skládá ze čtyř monosacharidů.¹



Obrázek 4 Struktura α -tomatinu



Obrázek 5 Struktura dehydrotomatinu

Množství α -tomatinu v rajčatech (Tabulka IV) je závislé na velikosti a zralosti rajčat, neboť jeho obsah je dočasný a zráním se snižuje na minimum.¹⁶ Zelené plody rajčat, ale i další části rostliny, obsahují tomatin. Při zjišťování obsahu tomatinu a jeho změn během dozrávání sklizených rajčat bylo zjištěno, že v zelených plodech se obsah tomatinu pohyboval od 30 do 150 mg/kg až po podlimitní koncentrace v červených plodech. Nejnižší obsah byl nalezen v červených, zralých a velkých rajčatech. Srovnatelné množství bylo nalezeno v malých červených předčasně uzrálých rajčatech a ve velkých žlutých plodech.²

Tabulka IV Obsah α -tomatinu v rajčatech^{1,3}

Zralost plodů	Obsah (mg/kg č.hm.)
Malá zelená (27 mm)	69
Velká zelená (50 mm)	45
Růžová	2,5
Světle červená	3,9
Velmi červená	1,6

Snížení obsahu α -tomatinu v rajčatech je také možno docílit vhodným skladováním. Rozhodující pro snížení obsahu glykoalkaloidu je teplota, vlhkost a také délka uskladnění.¹⁶

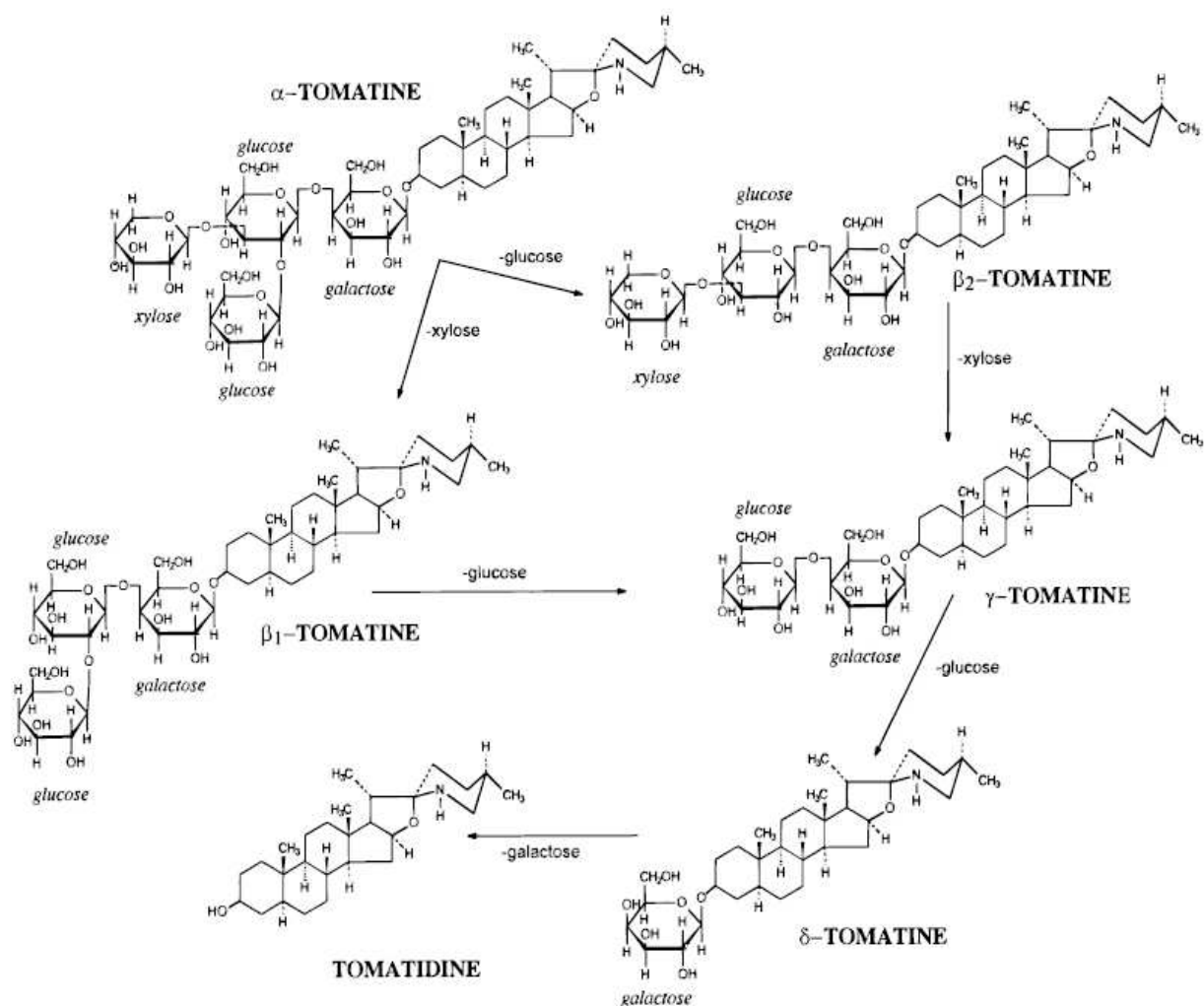
Glykoalkaloidy a to hlavně α -tomatin se nachází ve všech částech rostliny (Tabulka V), nejvíce je obsažen v listech a květech. Pro zemědělství a potravinářství je nejdůležitější obsah α -tomatinu v plodech, což představuje v porovnání s celou rostlinou minimální množství. Také oproti obsahu glykoalkaloidů v bramborách je ve zralých rajčatech jejich obsah nižší.

Tabulka V Rozložení α -tomatinu v rostlině rajčat^{11,3}

Část rostliny	Obsah (mg/kg č.hm.)
Květy	1148
Kořeny	402
Lodyha	351
Listy	1225
Plod	5 - 20

Kromě již zmíněného hlavního glykoalkaloidu (α -tomatinu) se v rajčatech nacházejí i minoritní zástupci, jedná se např. o β_1 -tomatin, β_2 -tomatin, γ -tomatin a δ -tomatin. Za minoritní glykoalkaloid rajčat lze považovat také dehydrotomatin.

β -, γ - a δ -tomatin vznikají z α -tomatinu parciální kyselou hydrolýzou. Přibližně v ekvimolárním množství vznikají nejprve příslušné β_1 - a β_2 -glykosidy, z nich vzniká γ -glykosid a dále δ -glykosid. Konečným produktem hydrolýzy je aglykon tomatidin, který je prakticky stabilní. Hydrolýza probíhá v prostředí 1 M HCl při 100 °C po dobu 20 minut. Glykoalkaloidy jsou následně vysráženy pomocí NaOH. Průběh hydrolýzy znázorňuje Obrázek 6.¹⁷



Obrázek 6 Hydrolýza α -tomatinu

2.5.2.1 Toxicita glykoalkaloidů rajčat

Mechanismus toxického působení α -tomatinu v rajčatech je stejný jako u α -solaninu a α -chaconinu v bramborách.¹ Účinky byly popsány v pasáži glykoalkaloidy brambor. Zdravotní potíže mohou vyvolat i nižší dávky α -tomatinu, uvádí se pravděpodobné embryotoxické a teratogenní účinky.²

Průměrná spotřeba rajčat a výrobků z rajčat se pohybuje mezi 13 - 27 g/osobu a den. Při konzumaci zralých rajčat se v nich obsah α -tomatinu pohybuje do 10 mg/kg čerstvé hmoty. V zelených nezralých rajčatech se obsah α -tomatinu může vyskytovat v rozmezí 50 - 200 mg/kg čerstvé hmoty. Denní příjem α -tomatinu se odhaduje na 0,04 mg/kg tělesné

hmotnosti. Z důvodu absence údajů o chronické toxicitě nebyla dosud stanovena hodnota NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), a tedy ani hodnota přípustného denního příjmu ADI (Acceptable Daily Intake).³ Limity pro přípustné množství glykoalkaloidů (vyjádřeno jako suma α -tomatinu, α -solaninu a α -chaconinu) v České republice byly popsány v kapitole toxicita glykoalkaloidů brambor.

2.5.3 Glykoalkaloidy lilku

V našich podmínkách by ve výživě obyvatel mohl být zdrojem glykoalkaloidů také baklažán – lilek vejcoplodý (*Solanum melongena* L.), původem z Východní Indie. Plody se používají jako zelenina. Konzumují se v mladém stavu před vyvinutím semen. V této konzumní zralosti obsahuje lilek v závislosti na odrůdě a podmínkách kultivace 3 až 15 mg glykoalkaloidů v 1 kg. Rozdíly v obsahu byly zjištěny v závislosti na stupni zralosti, zralejší plody obsahovaly více glykoalkaloidů než plody méně zralé.² Podobně jako u ostatních plodů je možné předpokládat zvýšení obsahu vlivem mechanického poškození i působením dalších faktorů s podobnými důsledky jako v případě bramborových hlíz a rajčat. Kromě dusíkatého solasoninu, který je běžný i v ostatních lilkovitých, jsou v baklažánech zastoupeny nedusíkaté steroidní saponiny melongosidy; aglykon mají diosgenin.^{2,18}

2.6 Nortropanové alkaloidy kalysteginy

Kalysteginy patří do početné skupiny přírodních alkaloidů a byly poprvé identifikovány v roce 1986. Jejich struktura byla zjištěna o čtyři roky později, roku 1990.³³

Název vychází z latinského názvu rostliny opletník plotní (*Calystegia sepium*) z čeledi svlačcovitých (*Convulvoceae*), kde byly původně detekovány. Tyto látky syntetizují též rostliny čeledi morušovníkovité (*Moraceae*) a lilkovité (*Solanaceae*).³⁴ Nejvíce typů kalysteginů bylo stanoveno v rostlinách posledně jmenované čeledi.³⁵ Zatím bylo identifikováno celkově 17 různých kalysteginů.

Kalysteginy byly nalezeny celkem v 9 rostlinách čeledi lilkovitých, které slouží pro lidskou výživu. Byla zjištěna značná variabilita v obsahu kalysteginů v jednotlivých vzorcích. Nejvyšší hladiny těchto alkaloidů byly celkově zjištěny v lilku vejcoplodém (*Solanum melongena*), paprice roční (*Capsicum annum*), nižší obsahy byly dále stanoveny v bramborách (*Solanum tuberosum*), rajčatech (*Lycopersicon esculentum*), paprice křovité

(*Capsicum frutescens*), rajčence (*Cyphomandra betaceae*), mochyňi peruánské (*Physalis peruviana*), mochyňi mexické (*Physalis exocarpa*) a lilku borůvkovitým (*Solanum scabrum*). Další rostliny, které obsahují kalysteginy a slouží pro lidskou výživu, jsou povijnice jedlá (*Ipomea batatas*) a morušovník bílý (*Morus alba*) z čeledi morušovníkovitých.³⁶ Většina těchto rostlin pochází z tropických a subtropických pásů a v Evropě se nekonzumují nebo jen výjimečně.

Data o obsahu kalysteginů v rostlinách jsou zatím velmi omezená, ale zdá se pravděpodobné, že největším zdrojem kalysteginů jsou, vzhledem ke konzumovanému množství, brambory.³⁶

Nejsou k dispozici žádná data o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci kalysteginů u experimentálních zvířat ani u lidí. Nejsou k dispozici ani žádné toxikologické studie, což může být vysvětleno faktem, že žádný z kalysteginů není zatím komerčně dostupný a jejich syntéza je velice složitá. Některé kalysteginy byly izolovány z rostlin a studovány *in vitro*. Tyto látky vykazují schopnost inhibovat glykosidázy, a to jak savčí (i lidské), tak i glykosidázy hub a rostlin. Schopnost a rozsah inhibice je závislý na stupni hydroxylace na nortropanovém kruhu. S rostoucím počtem hydroxylových skupin roste schopnost inhibice. Kalysteginy A tedy vykazují nízkou aktivitu jako glykosidázové inhibitory, kalysteginy B jsou více účinnější a kalysteginy C jsou velmi efektivní inhibitory glykosidáz. Specifita inhibicí závisí na kalysteginu.³⁶ Schopnost kalysteginů inhibovat glykosidázy by mohla mít za následek různé poruchy a zdravotní potíže hospodářských zvířat i lidí. Na druhou stranu je tato vlastnost zkoumána za účelem léčení cukrovky, rakoviny nebo virových onemocnění.^{34,37,38}

2.6.1 Struktura kalysteginů

Struktura kalysteginů, jak je vidět z následujícího obrázku (Obrázek 7), je velmi podobná pyranózové struktuře hexózy, kde atom kyslíku v pyranóze je nahrazen atomem dusíku. Všechny kalysteginy obsahují ve své molekule 3 základní strukturní znaky: nortropanový kruh, aminoketalovou skupinu (tvořena sousedící terciární hydroxylovou skupinou a aminoskupinou) a 2–4 další hydroxylové skupiny, které mají u jednotlivých kalysteginů různou pozici a stereochemii.³⁹ Kalysteginy jsou rozděleny na základě počtu hydroxylových skupin do 3 tříd:

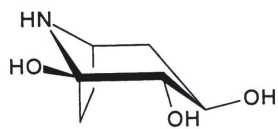
- A (kalysteginy A₃, A₅, A₆, A₇),
- B (kalysteginy B₁, B₂, B₃, B₄, B₅),
- C (kalysteginy C₁, C₂).

Kalysteginy ve skupině A mají 3, ve skupině B 4 a ve skupině C 5 hydroxylových skupin.⁴⁰ Později byly objeveny látky odvozené od výše popsaných kalysteginů. Mezi ně patří dihydroxynortropan, kalystegin N₁ (na uhlíku 1 má místo hydroxyskupiny aminoskupinu), N-methylované kalysteginy B₂ a C₂ a glykosidy kalysteginů B₁ a B₂.⁴¹

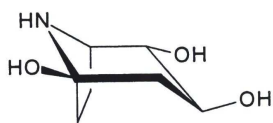
2.6.2 Biosyntéza kalysteginů

Předpokládá se, že intermediátem syntézy alkaloidů a tedy i kalysteginů je tropinon.⁵² Tropinon je v rostlinách syntetizován z L-ornithinu/L-argininu přes intermediát putrescin. Tato domněnka vychází ze studie již z roku 1988, kdy byl při kultivaci kořenů opletníku plotního *in vitro* do živného media přidán ¹⁴C-putrescin. Izotop uhlíku se zakomponoval do sloučenin, které byly pomocí tenkovrstvé chromatografie nerozeznatelné od kalysteginů a poskytovaly stejnou reakci s dusičnanem stříbrným při vizualizaci.³⁶

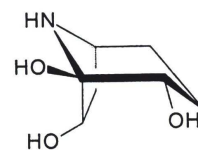
Schéma biosyntézy kalysteginů je znázorněno na následujícím obrázku (Obrázek 8). Významným enzymem je putrescin N-methyltransferáza (PMT), který odkloňuje průběh syntézy tak, že se nesyntetizují polyaminy ale alkaloidy. Vzniklý N-methylputrescin je metabolizován na keton tropinon, kde dochází k dalšímu větvení. Původně byla známa pouze jedna tropinon reduktáza (RT I), která konvertovala tropinon na tropin, který byl následně metabolizován na alkaloidy jako např. hyoscyamin, skopolamin nebo kokain. Později byl v kořenech blínu černého (*Hyoscyamus niger*) kultivovaných *in vitro* objeven podobný enzym, avšak s odlišnou stereospecifitou. Enzymy spolu koexistují v rostlinách. Druhý enzym tropinon reduktáza (RT II) redukuje tropinon na pseudotropin, z kterého dále dosud neobjasněným způsobem vznikají kalysteginy.⁶² Tento předpoklad vychází z následující studie. Do kultury kořenů opletníku plotního (*Calystegia sepium*) byl přidán ¹⁵N-tropinon. Izotop dusíku byl stopován v kalysteginech pomocí GC/MS a NMR metod. 6 dní po přidání ¹⁵N-tropinonu obsahovaly téměř všechny molekuly kalysteginu A₃ a přibližně polovina molekul kalysteginů B₁ a B₂ izotop dusíku.⁴³



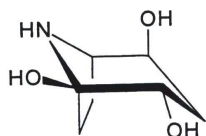
Calystegine A₃



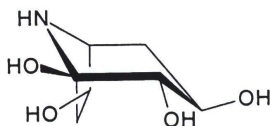
Calystegine A₅



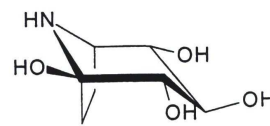
Calystegine A₆



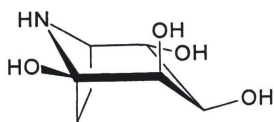
Calystegine A₇



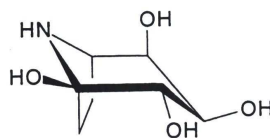
Calystegine B₁



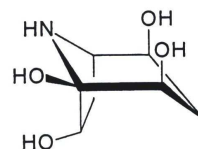
Calystegine B₂



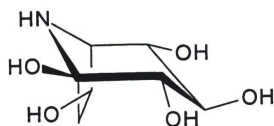
Calystegine B₃



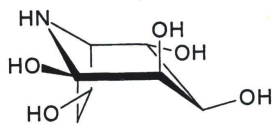
Calystegine B₄



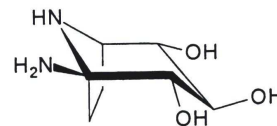
Calystegine B₅



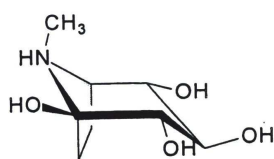
Calystegine C₁



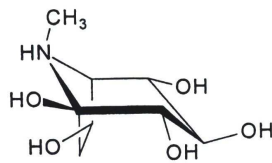
Calystegine C₂



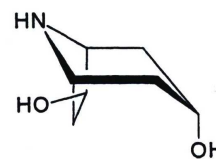
Calystegine N₁



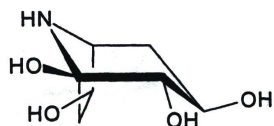
N-Methyl-calystegine B₂



N-Methyl-calystegine C₁



3 α ,7 β -Dihydroxynortropine



3-O- β -D-glucopyranosyl-calystegine B₁



4-O- β -D-galactopyranosyl-calystegine B₂

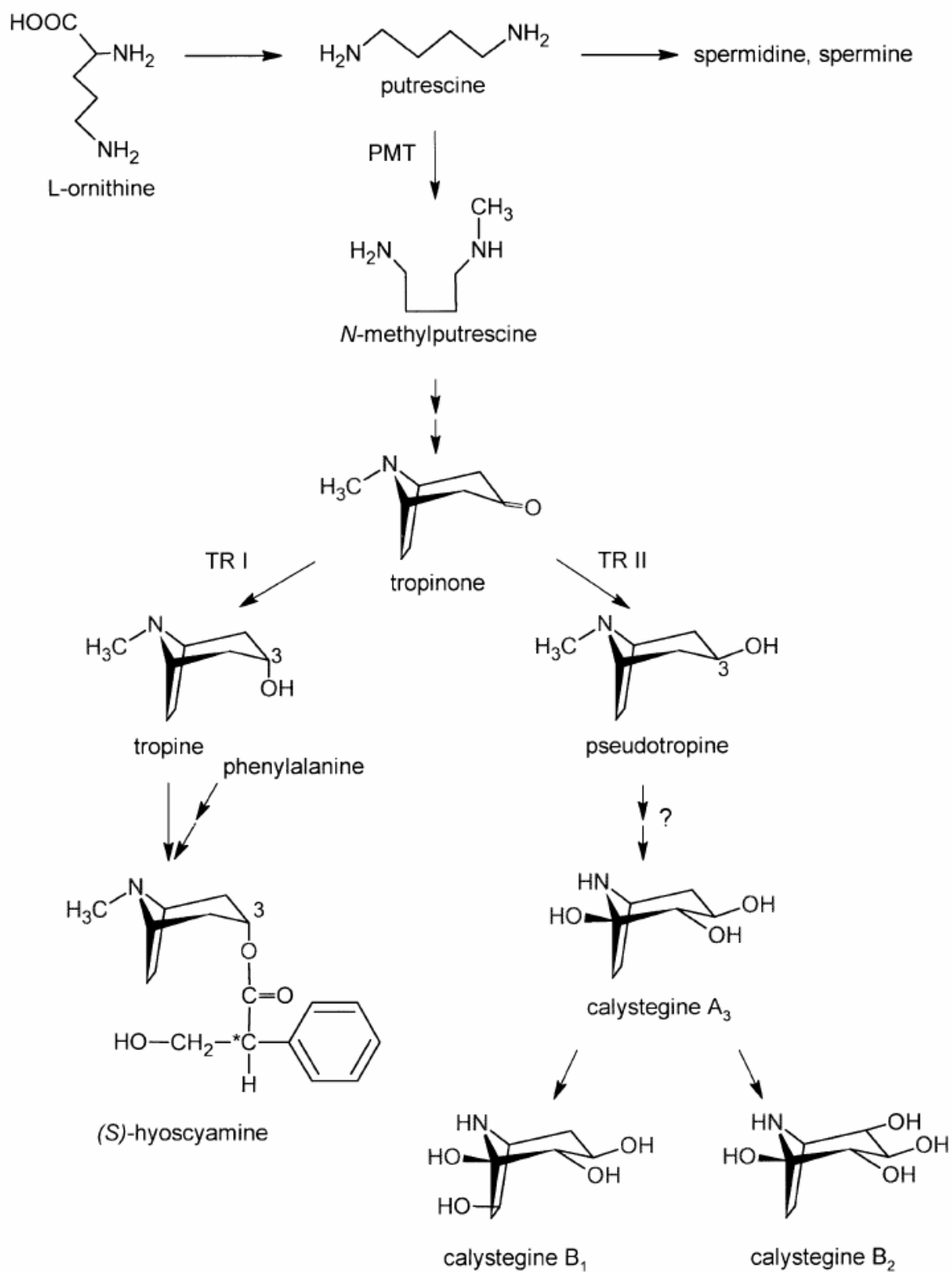
Obrázek 7 Struktury kalysteginů

Obě tropinonreduktázy jsou NADPH závislé dehydrogenázy s krátkým řetězcem. Aminokyselinová sekvence enzymů se z více než 50 % shoduje a předpokládá se, že mají stejného předchůdce.⁴³

Ačkoli nejsou dostupná žádná experimentální data, předpokládá se, že hydroxylové skupiny v molekule kalysteginů jsou na molekulu adovány až po vytvoření nortropanového kruhu. Enzymy, které demethylují a hydroxylyjí pseudotropin, zatím nejsou známy.

Enzym RT II byl následně izolován i z dalších rostlin, a to durmanu obecného (*Datura stramonium*), rulíku zlomocného (*Atropa belladonna*) a brambor (*Solanum tuberosum*). V kořenech rulíku zlomocného byl identifikován enzym RT II jako jediná přítomná tropinon reduktáza. Vzniklý pseudotropin není v kultivovaných kořenech této rostliny ani akumulován, ani nepodléhá izomeraci, ale je dále metabolizován, pravděpodobně na kalysteginy.⁴³

Experimenty naznačují, že nikotin a další tropanové alkaloidy hyoscyamin a skopolamin jsou syntetizovány v kořenech a prostřednictvím xylému (svazek dřevní části vodivého pletiva rostliny) přemístěny do nadzemních částí rostliny. Není známo, zda podobný mechanismus existuje u kalysteginů.³⁶



Obrázek 8 Schéma biosyntézy kalysteginů

2.6.3 Obsah kalysteginů v rostlinách čeledi lilkovitých

Původně se předpokládalo, že se kalysteginy vyskytují pouze v kořenech rostlin. Později se ukázalo, že téměř všechny rostliny, které obsahují kalysteginy v kořenech, obsahují vyšší hladiny těchto látek v nadzemních částech. Není známo, zda jsou v nadzemních částech kalysteginy i syntetizovány nebo pouze transportovány z kořenů. Koncentrace těchto alkaloidů v jedlých částech rostlin je relativně nízká, avšak tento závěr je učiněn na základě nedostatečného množství dat.³⁶

2.6.3.1 Obsah kalysteginů v čerstvých a skladovaných rostlinách

Výskyt kalysteginů se liší kvalitativně i kvantitativně v závislosti na rostlině i jejích částech.⁴⁴ Nejvyšší hladiny těchto látek jsou v lilku, paprikách a batátech (Σ kalysteginů (A_3 , B_1 , B_2 , C_1) až 80 mg/kg č. hm.), dále bramborách a rajčatech (Σ kalysteginů (A_3 , B_1 , B_2 , C_1) 1–10 mg/kg č. hm). Nízké koncentrace těchto látek obsahují některé exotické tropické a subtropické rostliny čeledi lilkovitých.³⁶

Největším zdrojem kalysteginů jsou vzhledem ke konzumovanému množství brambory. Existuje jen několik málo studií zabývajících se obsahem kalysteginů v bramborových hlízách. Velká variabilita v obsahu kalysteginů v bramborách by mohla být příčinou velmi odlišných hodnot publikovaných v literatuře. Např. (Nash a kol.) uvádí 0,01 % kalysteginů v bramborových slupkách, (Asano a kol.) zjistili obsah kalysteginů 3,4–7 mg/kg v celých hlízách a (Keiner a kol.) stanovili v dužnině brambor dokonce okolo 200 mg/kg kalysteginů.³⁵

Studie se většinou zabývají distribucí kalysteginů v hlízách a změnami jejich obsahu během zrání.

Byla studována distribuce kalysteginů v bramborové hlíze i nejedlých částech rostliny. Bylo zjištěno, že jejich obsah významně narůstá během skladování hlíz při 4 °C po dobu 5 měsíců. Původně obsahovaly všechny části hlízy (dužnina, slupka a očka) kalysteginů méně než 500 mg/kg č. hm. (Σ kalysteginů (A_3 , B_2 , B_4)). Po skladování byl sice obsah kalysteginů v dužnině poměrně nízký (okolo 200 mg/kg č. hm.), ale vysoký byl jejich obsah ve slupkách (1200–1400 mg/kg č. hm.), očkách (2100 mg/kg č. hm.) a 3 mm dlouhých klíčcích (3200 mg/kg č. hm.). S větší délkou klíčku klesal obsah kalysteginů a slupka v okolí klíčků obsahovala nižší hladiny kalysteginů než slupka vzdálenější.

Převládající sloučeninou ve všech vzorcích brambor byl kalystegin B₂ (60–80%), zbývající obsah tvořil téměř pouze kalystegin A₃. Poměr těchto kalysteginů byl většinou 2:1. Vzácně byl detekován též kalystegin B₄. Ostatní kalysteginy nebyly detekovány, ale mohly být přítomny v hladinách nižších než 10 mg/kg.³⁵

Tato data souhlasí s dřívějším pozorováním které naznačuje, že vysoký obsah kalysteginů je v klíčcích a slupce. Tyto tkáně obsahují také vysoké množství glykoalkaloidů α -solaninu a α -chaconinu. Použití bramborových slupek k výživě vzhledem k toxicitě glykoalkaloidů a možné toxicitě kalysteginů není proto příliš vhodné. Další studie naznačují že obsah kalysteginů je silně závislý na odrůdě a výběru vzorku.³⁶

Obsah kalysteginů ve slupce nevzrůstá vlivem osvětlení. Po klíčení brambor při světle jsou klíčky zelené a zakrslé a obsahují nižší hladiny kalysteginů, než klíčky brambor uchovávaných v temnu za jinak stejných podmínek.³⁵

Lze říci, že v rostlinách čeledi lilkovitých obsahujících více než jeden kalystegin je koncentrace kalysteginu B₂ mnohem vyšší než ostatních polyhydroxylovaných nortropanů. Byla zjištěna variabilita mezi obsahy a zastoupením jednotlivých kalysteginů jednak v bramborových hlízách, ale i lilku a paprikách zakoupených v Japonsku a Británii. Variabilita může být způsobena vlivem odrůdy, nebo různými podmínkami pěstování, sklizně a skladování.³⁶

2.6.3.2 Obsah kalysteginů ve zpracovaných rostlinách

Bramborové hlízy byly podrobeny kulinárním úpravám, za účelem zhodnocení expozice lidí kalysteginům přijímaných potravou. Vařením i pečením se celkový obsah kalysteginů snížil o 85 %, mikrovlnným ohřevem a smažením se obsah kalysteginů snížil o 80 %. Kalysteginy jsou dostatečně stabilní, aby se vyskytovali v komerčně dostupných produktech (instantní kaše, chipsy,...) a zdá se, že během některých procesů se jejich obsah může i zvýšit.³⁶

2.6.3.3 Obsah kalysteginů v rostlinách neurčených pro lidskou výživu

Potměchut' popínavá (*Solanum dulcamara*) je plevel, který roste hojně ve skandinávských zemích. Její zelené nezralé plody občas kontaminují skladovaný hrášek a způsobují riziko otravy. Bylo zjištěno, že listy této rostliny obsahují vedle glykoalkaloidů též

kalysteginy. V téže studii byl publikován obsah kalysteginů i v další rostlinách, a to: rulíku zlomocném (*Atropa belladonna*), lilku mochyňovitém (*Nicandra physalodes*) a dvou dalších rostlinách čeledi lilkovitých (neexistuje český název) – *Solanum simidiatum* a *Solanum kwebense*.⁴⁷ Poslední dvě jmenované rostliny sice neslouží k lidské výživě, ale bylo zjištěno, že způsobují neurologické poruchy známé jako syndrom šílených krav a „Maldronksiekte” u zvířat pasoucích se tam, kde rostou.

Kalysteginy byly nalezeny v řadě dalších rostlin z čeledi *Solanaceae*, které neslouží pro lidskou výživu, a to v rodech *Atropa*, *Brunfelsia*, *Datura*, *Physalis*, *Hyoscyamus*, *Mandragora*, *Scopolia*, *Solanum*, *Nicandra* a *Withania*.³⁴ Kalystegin B₂ byl většinou majoritním kalysteginem.³⁶

2.6.4 Hypotéza, proč rostliny syntetizují kalysteginy

Není známo, proč rostliny tyto látky syntetizují, ale existuje několik teorií. Jedna z hypotéz říká, že rostliny komunikují mezi sebou a s ostatními organismy a udržují rovnováhu v ekosystému prostřednictvím sekundárních metabolitů (mezi které řadíme i kalysteginy). Například fenolický metabolit acetosyringon syntetizovaný v porušených rostlinných tkáních indukuje transkripci virulentního genu v půdní bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Nebo flavonoidy vylučované kořeny luštěnin indukují transkripci nodulačních genů v bakteriích rodu *Rhizobia*. Původně se předpokládalo, že rostliny produkují kalysteginy jako obranu proti jiným rostlinám, které jsou na tyto látky citlivé a zároveň žijí v symbióze s půdními bakteriemi, které jsou schopny kalysteginy využít a tím je detoxifikovat. Tuto domněnku potvrzuje fakt, že kalysteginy se vyskytují v kořenech a jsou jimi vylučovány, a že některé bakterie jsou schopny využít kalysteginů jako zdroje uhlíku a dusíku. Jeden ze 42 testovaných kmenů bakterií žijících v rhizosféře byl schopen využít kalysteginy. Kmen byl identifikován jako *Sinorhizobium meliloti* 41 a schopnost degradovat kalysteginy měl zakódovanou v plazmidové DNA.³⁶ Tento kmen je schopen využít kalysteginy jako zdroj uhlíku a dusíku.⁴⁴

Mikroorganismy v půdě degradující kalysteginy nejsou obvyklé.⁴⁶ Původně se předpokládalo, že se vyskytují pouze v rhizosféře rostlin, které tyto látky syntetizují. Toto tvrzení se ukázalo jako nepravdivé, protože byly objeveny v rhizosféře rostliny (*Zea mays*), která kalysteginy nesyntetizuje.⁴⁴ Na základě experimentálních studií se odhaduje, že mikroorganismy degradující kalysteginy tvoří pouze pár procent všech bakterií rhizosféry,

kteře mohou být kultivovány. Mikroorganismy degradující kalysteginy jsou přítomny v půdě pravděpodobně také díky obsahu kalysteginů v kořenech odumřelých rostlin.

Ze studií hmyzu žijícího na příslušných rostlinách vyplývá, že kalysteginy vykazují alelopatickou aktivitu. Larvy lišaje smrtihlava (*Acherontia atropus*) se živí bramborami, ale neskladují v nich přítomné toxiny, ani toxiny ostatních rostlin druhů *Datura* a *Solanum*. Byl proveden pokus, kdy tento hmyz využíval po několik generací místo brambor ptačí zob obecný (*Ligustrum vulgare*). Po této periodě nebyli jedinci dále schopni krmit se jejich původní potravou. Pouze jediný exemplář přežil zakuklení na rostlině kmenu *Datura*. Housenky na bramborách byly líné a ochablé, měly vodnaté výkaly a vysokou mortalitu. Larvy neobsahovaly žádné glykoalkaloidy, naopak nortropanové alkaloidy byly detekovány u larev i dospělých jedinců.⁴⁷

Kromě výše popsaných účinků inhibuje kalystegin B₂ tvorbu semen a prodlužování kořenů vojtěšky (*Medicago sativa*). Je možné, že rostliny soutěžící s rostlinami produkující kalysteginy žijí v symbióze s půdními bakteriemi, které jsou schopny je detoxifikovat.³⁶

2.6.5 Toxikokinetika a toxicita kalysteginů

Nejsou k dispozici žádná data o absorpci, distribuci, metabolismu a exkreci kalysteginů u experimentálních zvířat ani u lidí. Není ani známo, zda mikroorganismy v gastrointestinálním traktu mají vliv na toxikokinetiku. Zdá se ale, že řada mikroorganismů v gastrointestinálním traktu přežvýkavců má vliv na metabolismus kalysteginů.³⁶

Vzhledem ke strukturální podobnosti s polyhydroxylovanými indolizidiny (např. nojirimycin, australin, kastanospermin, swainsonin, dihydroxymethyl-dihydroxypyrrolidin, atd.), které jsou významnými inhibitory glykosidáz, byla studována tato schopnost kalysteginů *in vitro*. Kalysteginy vykazují schopnost inhibovat glykosidázy, a to jak savčí (i lidské), tak i glykosidázy hub a rostlin.³⁶

Toxicita brambor je spojena s obsahem steroidních glykoalkaloidů. Symptomy otravy u lidí jsou zvracení, průjem, bolesti břicha a neurologické poruchy. Existuje málo důkazů, že zažívací problémy jsou způsobeny glykoalkaloidy. Kdyby glykoalkaloidy neinhibovaly glykosidázy, mohly by být gastrointestinální potíže způsobeny právě kalysteginy. Na druhé straně je výskyt otrav z brambor velice řídký a kalysteginy jsou konzumovány denně v různých potravinách bez známek toxických účinků. Nežádoucí účinky

mohou být způsobeny pravděpodobně pouze nadměrným příjmem těchto látek nebo se mohou vyskytnout u citlivých jedinců s genetickými dispozicemi k nízkým hladinám β -glukosidázy a α -galaktosidázy.³⁶ Vedle inhibice glykosidáz vykazují kalysteginy alelopatickou aktivitu, ovlivňují činnost imunitního systému a inhibují syntézu glykolipidů.^{34,36}

2.6.6 Kalysteginy jako glykosidázové inhibitory

Glykosidázy se účastní několika významných biologických procesů, jako je trávení, biosyntéza glykoproteinů nebo lysosomální katabolismus glykokonjugátů. Proto je kladen zvláštní důraz na biologickou aktivitu kalysteginů jako potenciálních inhibitorů glykosidáz člověka a hospodářských zvířat, přijímajících tyto látky potravou a krměním. Je pravděpodobné, že kalysteginy a jiné glykosidázové inhibitory způsobují onemocnění, které je obdobné genetickým poruchám těchto enzymů. Genetické poruchy určitých lysosomálních hydroláz způsobují řadu metabolických poruch postihujících intralysosomální trávení. Tyto dědičné poruchy metabolismu způsobují tzv. „lysosomal storage disease“. U lidí i zvířat byla identifikována řada dědičných lysosomálních poruch. Nejznámější jsou „Gauchers“ a „Fabrys disease“, které jsou způsobeny nedostatečnou aktivitou β -glukosidázy a α -galaktosidázy.³⁶

Vyvolané „lysosomal storage disease“ u hospodářských zvířat jsou známé a obdobné vrozeným chorobám. Sloučeniny způsobující tyto poruchy vyvolávají účinky, které jsou biochemicky, morfologicky i klinicky stejné jako u vrozených chorob. Aby mohla sloučenina způsobit fenokopii vrozené „lysosomal storage disease“, musí se snadno dostat k lysosomu, hromadit se v něm a dále inhibovat nebo redukovat aktivitu alespoň jedné hydrolázy v lysosomu ve všech tkáních.³⁶

Rostliny často obsahují více látek schopných inhibovat glykosidázy a je proto obtížné přisoudit efekt určité sloučenině.

2.6.7 Využití kalysteginů v lékařství

Využití kalysteginů v lékařství je diskutováno v souvislosti s léčením rakoviny, cukrovky, virových onemocnění (AIDS) a posílením imunity.^{34,37,48}

Cukrovka (*Diabetes*)

Intestinální oligo- a disacharidázy jsou pevně vázány na stěnu tenkého střeva. Tyto enzymy metabolizují sacharidy přijímané dietou na monosacharidy. Ty jsou absorbovány

střevní stěnou do krevního oběhu. Úplná nebo částečná inhibice aktivity těchto enzymů může regulovat absorpci monosacharidů. Zatím nebylo dosaženo jednoznačných závěrů.³⁶

Antivirová aktivita

Byla studována směs kalysteginů A a B z opletníku plotního (*Calystegia sepium*) kvůli možné inhibici HIV viru. Žádná aktivita nebyla detekována.³⁶

2.6.8 Zhodnocení poznatků o kalysteginech

Další data jsou zapotřebí, aby bylo možné objektivně posoudit vystavení lidí kalysteginům přijímaných potravou. Je nutné přesně určit způsob a místo biosyntézy, transport a uchovávání kalysteginů v rostlinách. Navržená biosyntetická dráha, popsána výše, potřebuje další důkazy. Například enzymy, které demethylují a hydroxylují pseudotropin, zatím nejsou známy. Pro posouzení rizika je nezbytné znát bioaktivitu kalysteginů samotných i v kombinaci s glykoalkaloidy.³⁶

3 STANOVENÍ OBSAHU ALKALOIDŮ

3.1 Metody stanovení glykoalkaloidů

Analytická koncovka stanovení glykoalkaloidů je dána jejich fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

3.1.1 Chromatografické metody

3.1.1.1 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Nejdéle se pro kvantitativní analýzu používá tenkovrstvá chromatografie (TLC, Tabulka V). Dosud bylo popsáno mnoho vyvíjecích soustav. Nejpoužívanějšími mobilními fázemi pro tenké vrstvy silikagelu jsou chloroform – methanol (19:1), chloroform - ethanol – 1% amoniak (2:2:2) a ethyl acetát – pyridin – voda (3:1:3). Detekce je prováděna Dragendorffovým činidlem (směs bazického dusičnanu bismutitého, kyseliny octové a jodidu draselného), jodem nebo chloridem antimonitým. TLC umožňuje spíše semikvantitativní analýzu.^{2,19}

Tabulka V Přehled metod tenkovrstvé chromatografie užívaných pro stanovení GA

Stacionární fáze	Mobilní fáze	detekce	Detekční limit (mg/kg)	zdroj
Silikagel 60	Chloroform-MeOH(2%)-NH ₃ (aq) (70:30:5)	Dragendorffovo činidlo	80 – 100	20
Silikagel 60	Chloroform-MeOH(2%)-NH ₃ (aq) (70:30:5)	Carr – Priceovo činidlo	20 – 30	20
Silikagel 60	Chloroform-MeOH(2%)-NH ₃ (aq) (70:30:5)	Paraformaldehydové činidlo	20 – 40	21
Silikagel 60	Chloroform-MeOH(2%)-NH ₃ (aq) (70:30:5)	Ce (IV) sulfátové činidlo	20 – 40	21
Silikagel 60	Chloroform-MeOH(2%)-NH ₃ (aq) (70:30:5)	Dragendorffovo činidlo	20 – 40	21

3.1.1.2 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie (GC) je užívána jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní stanovení glykosidů a aglykonů (Tabulka VI). Nevýhodou této metody je nutnost zařazení derivatizace v případě analýzy glykosidů a použití vysokých teplot nástřiku a separace (300°C). Za vyšších teplot může docházet k částečné degradaci analyzovaných látek, podmínky analýzy také negativně ovlivňují životnost kolon. Vyšší účinnost dělení, vyšší stabilitu a životnost přineslo až použití kapilárních kolon s chemicky vázanými fázemi. Pro detekci se většinou používá selektivní dusíko-fosforový detektor (NPD).

Samostatný aglykon se takto stanovuje po úplné hydrolýze glykosidů. V tomto případě již není možné rozlišit, zda se jedná o aglykon α -solaninu nebo α -chaconinu.^{2,19}

Tabulka VI Přehled metod plynové chromatografie užívaných pro stanovení glykoalkaloidů¹⁹

Fáze	Úprava vzorků	Detektor
OV-1	permethylace	FID
Dexsil 300	permethylace	FID
SE 30	silylace	neuveдено
OV 17	hydrolýza H ₂ SO ₄	FID
OV 17	hydrolýza HCl	NPD
OV 17	hydrolýza H ₂ SO ₄	NPD
CP-Sil 5*	hydrolýza HCl/CCl ₄	FID/NPD
CP-Sil 5*	hydrolýza HCl/CCl ₄	MS

* - kapilární kolona (v ostatních případech se jedná o kolony náplňové)

3.1.1.3 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Nejrozšířenější a zároveň také nejvýhodnější chromatografickou metodou vzhledem k nárokům na přípravu vzorků je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Pro separaci glykoalkaloidů a jejich aglykonů je možné použít široké spektrum chromatografických systémů (Tabulka VII).¹⁹ Nejčastěji se separace provádí na koloně plněné silikagelem s vázanými C18 skupinami (separace založená na různé hydrofobicitě glykoalkaloidů) nebo s vázanými aminopropylovými (Si-NH₂) skupinami (separace založená na rozdílné hydrofilitě glykoalkaloidů). Jako mobilní fáze se běžně používá směs acetonitrilu

a vody, popřípadě vodného pufru. Nejrozšířenější je UV detekce při vlnové délce $\lambda < 215$ nm. Je možné použít i detekci refraktometrickou. Kolony Si-NH₂ umožňují výrazně lepší separaci α -solaninu a α -chaconinu než Si-C18, analýzy jsou však časově náročnější. Určitý problém může představovat detekce. Glykoalkaloidy i jejich aglykony absorbují při nízkých vlnových délkách (205-215 nm). Proto UV detekce klade vysoké nároky na čistotu mobilní fáze, je omezeno použití gradientové eluce a přidávání různých aditiv do mobilní fáze. Touto metodou je možné detekovat také produkty parciální kyselé hydrolyzy α -solaninu a α -chaconinu (minoritní glykoalkaloidy)^{2,22} Pro detekci glykoalkaloidů je možné použít i méně citlivý refraktometrický detektor.¹⁹

Další možností stanovení glykoalkaloidů bez čištění a koncentrování vzorku před analýzou je spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS). Tato metoda umožňuje stanovení nejen α -solaninu, α -chaconinu a aglykonů, ale také minoritních glykoalkaloidů vznikajících z α -solaninu a α -chaconinu parciální hydrolyzou. Jedná se především o β_2 -solanin, β_1 - a β_2 - chaconin, γ -solanin a γ - chaconin. LC/MS analýza se provádí na kapalinovém chromatografu s hmotnostně selektivním detektorem.²³

Tabulka VII Přehled HPLC systémů používaných při analýze glykoalkaloidů

Kolona	Mobilní fáze	Detekce	Vlnová délka (nm)	Citace
-C ₈	(NH ₄) ₃ PO ₄ : H ₂ O : acetonitril (0,12 : 1 : 1)	UV	202	19
- NH ₂	acetonitril : ethanol : 0,005M KH ₂ PO ₄ (3 : 2 : 1, v/v)	UV	205	22
- NH ₂	acetonitril : 0,02M KH ₂ PO ₄ (3 : 1, v/v)	UV	208	24
- NH ₂	ethanol : acetonitril: 0,005M KH ₂ PO ₄ (3 : 2 : 1, v/v)	RI	-	19
- C ₁₈	acetonitril : voda (3 : 2, v/v)	UV	202	25
- C ₁₈	acetonitril : voda : ethanolamin (45 : 55 : 0,1, v/v)	UV	200	26
- CN	acetonitril : 9,8 mM KH ₂ PO ₄ (85 : 15 : v/v)	UV	200	27
- C ₁₈	acetonitril : voda : tetrahydrofuran (20 : 30 : 50)	UV	208	28
- C ₁₈	acetonitril : 100 mM (NH ₄) ₃ PO ₄ , (pH 3,5) (35 : 65, v/v)	UV	200	29
- C ₁₈	methanol : voda : H ₃ PO ₄	UV	205	30

	(95 : 30 : 0,1)			
-C ₁₈	acetonitril : 0,025M TEAP (pH 3), gradientová eluce	UV	205	31
-NH ₂	tetrahydrofuran : 0,025M KH ₂ PO ₄ : acetonitril (50:25:25)	UV	208	19
-NH ₂ (pro cukry)	tetrahydrofuran : voda : acetonitril (56:14:30)	UV	215	19
-C ₁₈	100 mM (NH ₄) ₃ PO ₄ , 35% acetonitril, pH=3,5 (pomocí H ₃ PO ₄)	MS	-	23
-C ₁₆ (NH ₂)	methanol : 0,1% kyselina octová gradientová eluce	MS	-	32

3.1.2 Kapilární isotachoforéza

Separční technikou, která využívá vlastností heterocyklické dusíkaté části molekuly glykoalkaloidů, je kapilární isotachoforéza. Tato technika umožňuje vedle sebe separovat glykoalkaloidy a jejich aglykony. Její výhodou jsou nízké provozní náklady. Nevýhodou je, že nelze separovat solanin od chaconinu. Časová náročnost je srovnatelná s HPLC.

3.1.3 Biochemické metody

Ke stanovení glykoalkaloidů je možné použít také biochemické metody (ELISA, RIA). Tyto postupy většinou nevyžadují extrakci ani čištění vzorku, přitom jsou poměrně rychlé, vysoce specifické a citlivé. Nevýhodou je však poměrně vysoká cena komerčně vyráběných imunologických preparátů. Imunochemické metody umožňují velmi rychlé stanovení glykoalkaloidů, nelze jimi ale oddělit solanin od chaconinu. Jsou vhodné pro screening velkého množství vzorků, zejména pro šlechtitelské účely. Kromě rychlosti se vyznačují vysokou specifičností a citlivostí.

3.1.4 MALDI-TOF MS

Metoda stanovení glykoalkaloidů nevyžadující čištění a koncentrování vzorku před analýzou, je hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS). Touto technikou lze stanovit jednotlivé glykoalkaloidy a to během dvou hodin 10 až 15 vzorků (včetně úpravy vzorku), zatímco metodou HPLC pouze jeden. Nevýhodou uvedené techniky jsou vysoké pořizovací náklady spektrometru.²

3.2 Metody stanovení kalysteginů

Kalysteginy jsou nízkomolekulární opticky aktivní látky. Většina kalysteginů jsou bezbarvé prášky, které jsou vzhledem k velkému počtu hydroxylových skupin vysoce polární, a tudíž velmi dobře rozpustné ve vodě. Díky atomu dusíku obsaženému v molekule se jedná o bazické sloučeniny.³⁶

3.2.1 Extrakce a přečištění

Vzhledem k významné hydrofilitě kalysteginů jsou vhodnými extrakčními činidly voda a methanol. V závislosti na typu matrice bývá methanol většinou preferován, zvláště, je-li v matrici přítomno hodně škrobu a ve vodě rozpustných mono- a oligosacharidů. Díky strukturální podobnosti jsou sacharidy nejvíce interferující sloučeniny v následné analýze.

Přečištění se provádí extrakcí na tuhou fázi (SPE). Vzhledem k bazickému charakteru kalysteginů je nejhojněji využívaným způsobem separace iontově výměnná chromatografie, která slouží k přečištění extraktu od neutrálních a kyselých sloučenin. Vesměs se používají pouze kolony se silnými katexy, na které se kalysteginy váží prostřednictvím sekundární aminoskupiny.³³

3.2.2 Metody stanovení

Počátečními metodami stanovení byly papírová elektroforéza a následně metody tenkovrstvé chromatografie, které mají uplatnění i v dnešní době. V současnosti se pro analýzu kalysteginů využívá následujících metod:

- GC (Gas Chromatography – plynová chromatografie),
- HPLC (High–Performance Liquid Chromatography – kapalinová chromatografie),
- CE (Capillary Electrophoresis – kapilární elektroforéza),
- TLC (Thin–Layer Chromatography – tenkovrstvá chromatografie).

3.2.2.1 Plynová chromatografie (GC)

Metody GC/MS se zdají být nejvíce účinnými metodami vzhledem k vysokému rozlišení plynové chromatografie a velké strukturální vypovídací schopnosti hmotnostní detekce. Analýza pomocí plynové chromatografie je možná pouze po předchozí derivatizaci,

jako například silylaci, která je zmiňována ve většině publikovaných metodách. Dále byly vyvinuty následující derivatizační postupy:

Derivatizace pomocí MSTFA v prostředí pyridinu po dobu 12 hodin při 60 °C. Za těchto drastických podmínek dojde k derivatizaci všech hydroxylových skupin i sekundární aminoskupiny. Tyto podmínky ale vedou k částečné destrukci analytů a jsou tedy vhodné pouze pro kvalitativní stanovení.

Derivatizace pomocí hexamethyldisilazanu obsahujícího 10% trichlorosilanu vede ke kompletní derivatizaci hydroxylových skupin, nedochází k derivatizaci aminoskupiny a k rozkladu analytů. Zdlouhavá derivatizace je hlavním nedostatkem plynové chromatografie.

Nejvyužívanějším způsobem detekce je hmotnostní spektrometrie (MS), možné je i použití plamenově-ionizačního detektoru (FID) a dusíko-fosforového detektoru (NPD).³³

3.2.2.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Metody tenkovrstvé chromatografie mají význam pro confirmaci nových efektivnějších metod, pro screeningová vyšetření a semikvantitativní analýzu. Jen několik málo výzkumů je zaměřeno na další vývoj těchto metod.

Největší nedostatek této metody je nízké rozlišení jednotlivých sloučenin a složitá detekce separovaných látek. Vizualizace se provádí většinou reakcí s dusičnanem stříbrným.

Pomocí TLC se kontroluje přečištění extraktů s použitím iontově výměnných SPE kolonek. Zde se pro vizualizaci využívá chlorine-*o*-toluidin kvůli jeho vysoké citlivosti pro aminokyseliny, které jsou hlavní interferující složkou kalysteginové frakce.

Densitometrická kvantifikace kalysteginů pomocí TLC je možná po mnohonásobném vyvíjení. Separace strukturně příbuzných kalysteginů a jejich prekurzorů, nortropanů, může být docíleno vícekrokovým vyvíjením a vhodným výběrem různých směsí rozpouštědel.³³

3.2.2.3 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Většina metod kapalinové chromatografie využívá NH₂ kolon. Podobně jako u plynové chromatografie je nyní nejlepším způsobem detekce hmotnostní spektrometrie.

Vzhledem ke struktuře kalysteginů se nabízí použití refraktometrického detektoru ve spojení s kapalinovou chromatografií. Refraktometrický detektor však není dostatečně citlivý

pro kvantifikaci kalysteginů izolovaných z rostlinných materiálů. Největším nedostatkem je nemožnost použití gradientové eluce, která je nezbytná pro úspěšnou separaci analytů. Díky volným hydroxyskupinám a heteroatomu dusíku jsou kalysteginy oxidovatelné látky a mohou být detekovány pomocí detektoru elektronového záchytu (ECD). Dalším možným způsobem detekce je amperometrická detekce.³³

3.2.2.4 Kapilární elektroforéza

Byla zkoumána možnost využití zónové kapilární elektroforézy pro separaci kalysteginů. Separaci předcházela tvorba borátového komplexu. Tento komplex, na rozdíl od volných kalysteginů, silně absorbuje v UV oblasti při 191 nm a může být stanoven spektrofotometricky.³⁷ Jiní autoři použili pro stanovení kalysteginů kapilární elektroforézu s pulsní amperometrickou detekcí, kdy jsou hydroxylové skupiny kalysteginů oxidovány na zlaté elektrodě. Touto metodou bylo dosaženo rozlišení kalysteginů se stejným počtem hydroxylových skupin. Výhodou této metody oproti plynové chromatografii je absence přečišťovacích kroků. Vzorky mohou být analyzovány přímo po filtraci hrubého extraktu. Metoda je vhodná spíše pro kvalitativní stanovení, kvantitativní stanovení vyžaduje častou kalibraci měřicího zařízení.⁴⁹

Detekční limity uvedených metod jsou shrnuty v Tabulce VIII.

Tabulka VIII Detekční limity vybraných metod v $\mu\text{g/ml}$

Metoda stanovení	Kalystegin							Odkaz
	A ₃	A ₅	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	C ₁	
GC/MS	2	2	1	1	1	1	1	34
CE/UV	– ^a	25	35	50	– ^a	– ^a	– ^a	37
GC/MS	1	1	1	1	1	1	1	35
CE/PAD	– ^a	– ^a	– ^a	0,5	– ^a	– ^a	– ^a	49

^a detekční limit nebyl uveden.

3.2.3 Syntéza kalysteginu B₂

Žádný z kalysteginů zatím není komerčně dostupný a jejich syntéza je velmi složitá. Byla popsána syntéza obou enantiomerů kalysteginu B₂, jak přírodního (+)–kalysteginu B₂, tak (–)–kalysteginu B₂, který se v přírodě nevyskytuje.⁵⁰

V nedávné době byla publikována rychlá a efektivní syntéza kalysteginu B₂. Vychází z D–glukózy, z které se snadno připraví 6–jodoglukopyranóza. Ta podléhá v klíčovém kroku reakce trojnásobnému redukčnímu otvírání kruhu za katalýzy zinku v prostředí benzylaminu a allylbromidu v bezvodém tetrahydrofuranu. Aminoskupina vzniklého aminodienu je následně chráněna benzykarbamátem a takto vzniklá sloučenina je podrobena uzavírání kruhu pomocí Grubbsova katalyzátoru v prostředí dichlormethanu. Následuje hydroborace vzniklého alkenu boranmethylsulfidovým komplexem v diethyletheru, dalším krokem je oxidační reakce s peroxidem vodíku. Vzniká alkohol, který je oxidován pyridinium chlorchromátem v prostředí dichlormethanu na příslušný keton. Ten je zbaven chránící skupiny aminu a hydrogenován za katalýzy Pd/C v prostředí kyseliny octové. Vzniklý kalystegin B₂ se přečistí iontově výměnnou chromatografií, následovanou gelovou zaostřovací chromatografií. Výtěžek reakce je 25 % a dle názoru autorů by mohl být postup použit pro syntézu ostatních kalysteginů.⁵¹

4 ZÁVĚR

Výskyt přírodních toxinů v potravinách a zemědělských plodinách představuje pro konzumenty zdravotní riziko, které může být z hlediska bezpečnosti potravin větší než je riziko z příjmu kontaminujících syntetických látek v potravě. Obavy konzumentů a odborníků se pokud jde o bezpečnost potravin značně liší. Vědci kladou na první místa riziko z mikrobiální kontaminace a nutriční nevyváženost (nadbytek nebo deficienci živin) následovanou přítomností environmentálních kontaminantů. Riziko plynoucí z obsahu přírodních toxinů v potravinách je v pořadí na třetím místě, následováno obsahem reziduí pesticidů a obsahem potravinových aditiv. Riziko z přírodních toxinů není širokou veřejností považováno za významné. Konzumenti se v některých případech mylně domnívají, že expozice karcinogenům a dalším toxinům je způsobena především syntetickými chemikáliemi. Je však prokázáno, že 99 % ze všech konzumovaných pesticidů je přírodního původu, jedná se o toxiny produkované rostlinami k vlastní ochraně proti plísním a predátorům.

Ze srovnávací toxikologické studie realizované v USA vyplývá, že konzumace přírodních pesticidů odpovídá přibližně 1500 mg na osobu a den, to je asi 10 000 x více než je konzumace syntetických reziduí. Konzumace reziduí syntetických chemikálií, včetně syntetických pesticidů, které jsou považovány z toxikologického hlediska za nejvýznamnější, je v průměru pouze 0,09 mg na osobu a den (Ames, 1993). V současné době je legislativně regulován pouze omezený počet kontaminantů přítomných v potravinách.

Pro zajištění chemické bezpečnosti potravin a formulaci příslušných legislativních opatření je potřeba komplexní znalosti a dostupnosti informací o dané skupině biologicky aktivních sloučenin, jejichž dietární příjem může vyvolat negativní zdravotní efekty.

V posledních letech je pozornost vědeckého výboru pro potraviny (SCF) v EU zaměřena též na některé přírodní toxiny včetně alkaloidů. Jedná se o přírodní dusíkaté látky velmi rozdílných struktur a vlastností, které vznikají jako sekundární metabolity rostlin a vykazují v závislosti na konzumovaném množství různé biologické účinky. Z hlediska potravního řetězce člověka hrají významnou roli alkaloidy, vyskytující se v některých rostlinách čeledi lilkovitých. Potravinářský význam mají rody lilek (*Solanum*) a rajče (*Lycopersicon*), k nimž se řadí brambory (*S. tuberosum*), lilek vejcoplodý čili baklažán (*S.*

melongena) a rajčata (*L. esculentum*). Kromě základních potravinářských plodin mohou do potravního řetězce pronikat některé toxické pyrrolizidinové alkaloidy z plevelných rostlin, problém může představovat také izochinolinový alkaloid nezralých makovic – morfin.

V rámci předkládané studie byly podrobně popsány některé toxické látky patřící do skupiny alkaloidů. Detailní pozornost byla věnována látkám významným z hlediska potravního řetězce člověka a to steroidním glykoalkaloidům brambor a rajčat a nově objeveným a sledovaným nortropanovým alkaloidům přítomným především v bramborách - kalysteginům. Cílem předkládané studie bylo sledování výskytu toxických alkaloidů v potravinářsky významných plodinách, zmapování jejich distribuce v jednotlivých částech rostlin a posouzení vlivu pěstování, zrání a skladování na jejich obsah. Vzhledem k tomu, že se jedná o přirozeně toxické látky, které jsou součástí ochranných systémů rostlin a k jejich zvýšené produkci dochází zejména ve stresových situacích, jako jsou nepříznivé klimatické podmínky nebo napadení škůdci, byl také podrobně popsán vliv těchto nepříznivých podmínek na jejich obsah. Dokumentován byl vliv kulinárních úprav na obsah toxických alkaloidů. Popsány byly běžné hladiny sledovaných alkaloidů v čerstvých i skladovaných rostlinách. V rámci předkládané studie byly shromážděny dostupné informace o vlastnostech jednotlivých významných alkaloidů a jejich biologických účincích. Detailně byly shrnuty dosud známé údaje o jejich toxicitě a uvedena případná existující legislativní opatření. Pozornost byla také věnována biosyntéze těchto toxinů v rostlinách a možnostem jejich degradace. Popsány byly analytické metody, umožňující stanovení hladin sledovaných toxických alkaloidů v potravním řetězci člověka.

5 LITERATURA

- ¹ Velíšek J.: *Chemie potravin*, OSSIS Tábor, (1-3), (2002).
- ² Zrůst J.: Glykoalkaloidy u brambor a ostatních komodit, Vědecká práce VVF: PROJ/2003/19/deklas, (2004).
- ³ Nordic Council of Ministers, Glycoalkaloids in tomatoes, eggplants, pepper and two *Solanum* species growing wild in the Nordic countries, TemaNord 599, (1999).
- ⁴ Zrůst J., Horáčková V., Přichystalová V., Rejklová M.: Obsah glykoalkaloidů v potravinářských výrobcích z brambor, Vědecké práce 14 - Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, 145-155 (2003).
- ⁵ Laurila J.: Interspecific hybrids of potato: Determination of glykoalkaloid aglycones and influence of bacterial infection, *Disertační práce* (2004).
- ⁶ Maga J. A.: Potato glykoalkaloidy, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 371-405 (1980).
- ⁷ Kuhn R. and Löw I.: Die Konstitution des Solanins, *Angel. Chem.*, **66**, 639-640 (1954).
- ⁸ Zwenger C. and Kind A.: Über das Solanin und Essen Spaltungs Producte, *Ann. Chem. Pharm.*, **118**, 129-151 (1861).
- ⁹ Zrůst J., Přichystalová-Fialková V., Hlásek J., Jůzl M.: Obsah α -chaconinu, α -solaninu v hlízách velmi ranných odrůd brambor, Vědecká práce VÚBHB, 13 (1999).
- ¹⁰ Mazurczyk A.: Vliv genotypu, zralosti ročníku, balení a expozice světla na akumulaci glykoalkaloidů v hlízách brambor, *Bramborářství*, **6** (1) (1998).
- ¹¹ Percival G. C., Dixon G. R.: Glycoalkaloids, *Handbook of plant and fungal toxicants* (D'Mello J.P.F.), 19-35 (1997).
- ¹² Zrůst J., Čepl: Glykoalkaloidy – vážný problém bramborářství, *Bramborářství*, **3**(1), 6-8 (1995).
- ¹³ Zrůst J.: Obsah glykoalkaloidů (alfa-chaconinu a alfa-solaninu) v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum L.*) a v nejrozšířenějších výrobcích z nich, Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod, číslo projektu: EP 09600065632004 (2004), <http://www.agroporadenstvi.cz/default.asp?ids=1979&ch=207&typ=1&val=31579>, dne 29. 4. 2006.
- ¹⁴ Friedman M., McDonald G. M.: Acid-catalyzed partial hydrolysis of carbohydrate groups of the potato glykoalkaloid α -chaconine in alcoholic solutions, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1501-1506 (1995).

- ¹⁵ Smith D. B., Roddick J. G., Jones J. L.: Potato glycoalkaloids: Some unanswered questions, *Trends in Food Science & Technology*, **7**, 126-131 (1996).
- ¹⁶ Davídek J.: *Natural Toxic Compounds of Foods*, CRS Press, 22-39 (1995).
- ¹⁷ Friedman M., Kozukue N., Harden L. A.: Preparation and characterization of acid hydrolysis products of the tomato glycoalkaloid α -tomatine, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 2096-2101 (1998).
- ¹⁸ Kintia P. K. and Shrets S. A.: Melongoside L and melongoside, steroidal saponins from *Solanum melongena* seed, *Phytochemistry*, **24**, 197-198 (1985).
- ¹⁹ Kalač P. jr., Voldřich M.: Metody stanovení obsahu steroidních glykoalkaloidů v potravinách a potravinářských surovinách, *Potr. Vědy*, **12**, 223-232 (1994).
- ²⁰ Ferreira F., Moyna P., Soule S., Vázquez A.: Rapid determination of solanum glycoalkaloids by thin-layer chromatographic scanning, *J. of Chrom A*, **653**, 380-384 (1993).
- ²¹ Simonovska B., Vovk I.: High-performance thin-layer chromatographic determination of potato glycoalkaloids, *J. of Chrom A*, **903**, 219 – 225 (2000).
- ²² Schulzová V., Hajšlová J., Roztočil T., Voldřich M.: Stanovení obsahu glykoalkaloidů α -solaninu a α -chaconinu v bramborách metodou HPLC, *Potrav. vědy*, **10** (4), 281-292 (1992).
- ²³ Friedman M., McDonald G., Haddon W. F.: Kinetics of acid-catalyzed hydrolysis of carbohydrate groups of potato glycoalkaloids α -chaconine and α -solanine, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1397-1406 (1993).
- ²⁴ Saito K., Horie M., Hoshino Y., Nose N.: High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potato products, *J. Chromatogr.*, **508**, 141-147 (1990).
- ²⁵ Houben R. J., Brunt K.: Determination of glycoalkaloids in potato tubers by reverse-phase high-performance chromatography, *J. of Chrom. A*, **661**, 169-174 (1994).
- ²⁶ Percival G., Dixon G. R.: Glycoalkaloid concentrations in aerial tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.), *J. Sci. Food Agric.*, **70**, 439-448 (1996).
- ²⁷ Hellenäs K.-E., Nyman A., Slanina P., Loof L, Gabriellsson J.: Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in blood serum by high-performance liquid chromatography, *J. of Chrom.*, **573**, 69-78 (1992).
- ²⁸ Bushway R. J., Barden E. S., Bushway A. W., Bushway A. A.: High-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids, *J. of Chrom.*, **178**, 533-541 (1979).

- ²⁹ Friedman M., Levin C. E.: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of potato glycoalkaloids and hydrolysis products on acidic columns, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 2157-2163 (1992).
- ³⁰ Kobayashi K., Powell A. D., Toyoda M., Saito Y.: High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous analysis of solanine and chaconine in potato plants cultured in vitro, *J. of Chrom.*, **462**, 357-364 (1989).
- ³¹ Väänänen T., Kuronen P., Pehu E.: Comparison of commercial solid-phase extraction sorbents for the sample preparation of potato glycoalkaloids, *J. of Chrom. A*, **869**, 301-305 (2000).
- ³² Cataldi T. R. I., Lelario F., Bufo S. A.: Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 3103-3110 (2005).
- ³³ Dräger B.: Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, **978**, 1-35 (2002).
- ³⁴ Bekkouche K., Daali Y., Cherkaoui S., Veuthey J., Christen P.: Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry*, **58**, 455-462 (2001).
- ³⁵ Keiner R., Dräger B.: Calystegine distribution in potato (*Solanum tuberosum*) tubers and plants. *Plant Science*, **150**, 171-179 (2000).
- ³⁶ Andersson H.Ch.: Calystegine alkaloids in Solanaceous food plants. *Temaword 2002*:513.
- ³⁷ Daali Y., Bekkouche K., Cherkaoui S., Christen P., Veuthey J.: Use of borate complexation for the separation of non-UV-absorbing calystegines by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, **903**, 237-244 (2000).
- ³⁸ Schimming T., Jenett-Siems K., Mann P., Tofern-Reblin B., Milson J., Johnson R.W., Deroin T., Austin D.F., Eich E.: Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convulvoceae. *Phytochemistry*, **66**, 469-480 (2005).
- ³⁹ Asano N., Yokoyama K., Sakurai M., Ikeda K., Haruhisa K., Kato A., Arisawa M., Höke D., Dräger B., Watson A.A., Nash R.J.: Dihydroxynortropine alkaloids from calystegine-producing plants. *Phytochemistry*, **57**, 721-726 (2001).
- ⁴⁰ Griffin W.J., Lin G.D.: Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, **53**, 623-637 (2000).
- ⁴¹ Schimming T., Tofern B., Mann P., Richter A., Jenett-Siems K., Dräger B., Asano N., Gupta M.P., Correa M.D., Eich E.: Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convulvoceae. *Phytochemistry*, **49**, 1989-1995 (1998).

- ⁴² Scholl Y., Asano N., Dräger B.: Automated multiple development thin layer chromatography for calystegines and their biosynthetic precursors. *Journal of Chromatography A*, 928, 217–224 (2001).
- ⁴³ Dräger B.: Tropine reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry*, 67, 327–337 (2006).
- ⁴⁴ Rothe G., Garske U., Dräger B.: Calystegines in root cultures of *Atropa belladonna* respond to sucrose, not to elicitation. *Plant Science*, 160, 1043–1053 (2001).
- ⁴⁵ Guntli D., Burgos S., Moëgne-Loccoz Y., Défago G.: Calystegine degradation capacities of microbial rhizosphere communities of *Zea mays* (calystegine-negative) and *Calystegia sepium* (calystegine positive). *FEMS Microbiology Ecology*, 28, 75–84 (1999).
- ⁴⁶ Guntli D., Heeb M., Moëgne-Loccoz Y., Défago G.: Contribution of calystegine catabolic plasmid to competitive colonization of the rhizosphere of calystegine-producing plants by *Sinorhizobium meliloti* Rm41. *Molecular Ecology*, 8, 855–863 (1999).
- ⁴⁷ Nash R.J., Rothschild M., Porter E.A., Watson A.A., Waigh R.D., Waterman P.G.: Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's-head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry*, 34, 1381–1283 (1993).
- ⁴⁸ Schimming T., Jenett-Siems K., Mann P., Tofern-Reblin B., Milson J., Johnson R.W., Deroin T., Austin D.F., Eich E.: Calystegines as chemotaxonomic markers in the *Convolvaceae*. *Phytochemistry*, 66, 469–480 (2005).
- ⁴⁹ Rüttinger H.H., Dräger B.: Pulsed amperometric detection of calystegines separated by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 925, 291–296 (2001).
- ⁵⁰ Boyer F.D., Lallemand J.Y.: Enantioselective Syntheses of Polyhydroxylated Nortropine Derivates: Total Synthesis of (+) and (–)-Calystegine B2. *Tetrahedron*, 50, 10443–10458 (1994).
- ⁵¹ Boyer F.D., Hanna I.: A short and efficient synthesis of (+)-calystegine B2. *Tetrahedron Letters*, 42, 1275–1277 (2001).
- ⁵² Brock A., Bieri S., Christen P., Dräger B.: Calystegines in wild and cultivated *Erythroxylum* species. *Phytochemistry*, 66, 1231–1240 (2005).

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AIDS	syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)
CL	chemiluminiscenční detekce
CE	kapilární elektroforéza (Capillary Electrophoresis)
DAD	spektrometrický detektor s diodovým polem (Diod Array Detector)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (DeoxyriboNucleic Acid)
ECD	detektor elektronového záchytu (Electron Capture Detector)
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Essay
EU	Evropská unie
FID	plamenoionizační detektor (Flame Ionization Detector)
FLD	fluorimetrický detektor (Fluorescence Detector)
GA	glykoalkaloidy
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (Gas Chromatography/Mass Selective detection)
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (Liquid Chromatography/Mass Selective detection)
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (Liquid Chromatography/tandem Mass Selective detection)
LOD	limit detekce (Limit of Detection)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantification)
M	koncentrace v mol/l
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Selective)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem Mass Selective)
MSTFA	N–methyl-N–(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normální fáze (Normal Phase)
NPD	dusíkofofosforový detektor (Nitrogen-Phosphorous detector)
PAD	pulsní amperometrická detekce (Pulsed Amperometric Detection)
RI	refraktometrický detektor (Refractive Index Detection)
RSD	relativní směrodatná odchylka (Relative Standard Deviation)
SFC	Vědecký výbor pro potraviny (Scientific Food Committee)
SPE	extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography)
UV	spektrometrický detektor v ultrafialové oblasti (Ultra Violet Detection)